

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-505058

(P2003-505058A)

(43) 公表日 平成15年2月12日 (2003.2.12)

(51) IntCl.	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		A 6 1 K 31/711	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/711		45/00	4 B 0 2 4
45/00		48/00	4 B 0 6 3
48/00		A 6 1 P 9/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 9/00		9/10	4 C 0 8 6
			1 0 1
		審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 78 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-511949(P2001-511949)
 (86) (22) 出願日 平成12年7月19日 (2000.7.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年1月23日 (2002.1.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP00/06986
 (87) 国際公開番号 WO01/007066
 (87) 国際公開日 平成13年2月1日 (2001.2.1)
 (31) 優先権主張番号 9917405.4
 (32) 優先日 平成11年7月23日 (1999.7.23)
 (33) 優先権主張国 イギリス (GB)

(71) 出願人 ザ、ユニバーシティー、オブ、ダンディー
 THE UNIVERSITY OF D
 UNDEE
 イギリス国ダンディー、パース、ロード、
 11

(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療法および薬剤スクリーニング法

(57) 【要約】

患者においてマクロファージから泡沫細胞の発生を防止または減少させるか、あるいは泡沫細胞を除去する方法であって、有効量のPPARδ活性の阻害物質を患者に等することを含む方法。患者におけるプラーク形成に付随する血管疾患および/または血管の血栓性遮断を予防または治療する方法であって、有効量のPPARδ活性の阻害物質を患者に投与することを含む方法。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 マクロファージまたは他の細胞からの泡沫細胞発生を予防または減少させるか、あるいは泡沫細胞を除去する方法であって、該マクロファージまたは他の細胞あるいは泡沫細胞を有効量のPPAR δ 活性の阻害物質と接触させることを含む方法。

【請求項2】 患者においてマクロファージまたは他の細胞からの泡沫細胞の発生を予防または減少させるか、あるいは泡沫細胞を除去する方法であって、有効量のPPAR δ 活性の阻害物質を患者に投与することを含む方法。

【請求項3】 マクロファージまたは他の細胞からの泡沫細胞発生が、アテローム性動脈硬化症またはアテローム性動脈硬化症に付随する疾患、心疾患、卒中、末梢動脈疾患、狭心症、再発狭窄症およびアテロームの任意の一つと関連する請求項2記載の方法。

【請求項4】 患者におけるプラーク形成に付随する血管疾患および/または血管の血栓性遮断の予防または治療法であって、有効量のPPAR δ 活性の阻害物質を患者に投与することを含む方法。

【請求項5】 血管疾患がアテローム性動脈硬化症、心疾患、卒中または末梢動脈疾患のうちの任意の一つである請求項4記載の方法。

【請求項6】 細胞の増殖を予防または減少させる方法であって、該細胞をPPAR δ 活性の阻害物質と接触させることを含む方法。

【請求項7】 患者における癌を治療または予防する方法であって、有効量のPPAR δ 活性の阻害物質を患者に投与することを含む方法。

【請求項8】 癌が、皮膚癌、乳癌、結腸癌または前立腺癌のうちのいずれか一つである請求項6記載の方法。

【請求項9】 患者におけるアルツハイマー病を治療または予防する方法であって、有効量のPPAR δ 活性の阻害物質を患者に投与することを含む方法。

【請求項10】 PPAR δ 活性の阻害物質が、細胞におけるPPAR δ の発現を防止する化合物である前記請求項のいずれか一つに記載の方法。

【請求項11】 化合物が核酸ベースの分子である請求項10記載の方法。

【請求項12】 細胞におけるPPAR δ 活性の核酸ベースの阻害物質が、

PPAR δ 一選択性アンチセンス分子またはPPAR δ 一選択性リボザイムのいずれか一つである請求項11記載の方法。

【請求項13】 化合物がPPAR δ 蛋白活性の活性を阻害する請求項1ないし9のいずれか一つに記載の方法。

【請求項14】 PPAR δ 活性の阻害物質がPPAR作用物質の効果を遮断する前記請求項いずれか一つに記載の方法。

【請求項15】 医薬において使用されるPPAR δ 活性の阻害物質。

【請求項16】 PPAR活性の阻害物質および医薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項17】 患者においてマクロファージからの泡沫細胞の発生を予防または減少させるか、あるいは泡沫細胞を除去するための医薬の製造におけるPPAR δ 活性の阻害物質の使用。

【請求項18】 プラーク形成に付随する血管疾患および／または血管の血栓性遮断を予防または治療するための医薬の製造におけるPPAR δ 活性の阻害物質の使用。

【請求項19】 癌を治療または予防するための医薬の製造におけるPPAR δ 活性の阻害物質の使用。

【請求項20】 アルツハイマー病を治療または予防するための医薬の製造におけるPPAR δ 活性の阻害物質の使用。

【請求項21】 医療において有用である化合物を産生するためのリード化合物として用いてもよい、または用いることができる化合物を同定する方法であって、PPAR δ 活性を阻害する化合物を選択することを含む方法。

【請求項22】 (1) マクロファージまたは他の細胞からの泡沫細胞の発生を予防または減少させるか、または泡沫細胞を除去するか；あるいは(2) プラーク形成および／または血管の血栓性遮断に付随する血管疾患を予防するかまたはその治療において有用であるか；あるいは(3) 癌を予防するかまたは癌の治療において有用であるか；あるいは(4) アルツハイマー病を予防するかまたはアルツハイマー病の治療において有用な化合物を産生するためのリード化合物として用いてもよい、あるいは用いることができる化合物の同定法であって、P

PAR活性を阻害する化合物を選択することを含む方法。

【請求項23】 同定された化合物が、その後、(1)マクロファージまたは他の細胞からの泡沫細胞の発生を予防するかまたは減少させるか、あるいは泡沫細胞を除去するかどうか；あるいは(2)プラーク形成に付随する血管疾患および／または血管の血栓性遮断を予防するかまたはその治療において有用であるか；あるいは(3)癌を予防するかまたは癌の治療において有用であるか；あるいは(4)アルツハイマー病を予防するかまたはアルツハイマー病の治療において有用であるかどうかを決定するためのスクリーンにおいて試験される請求項22記載の方法。

【請求項24】 リード化合物として同定された化合物が修飾される請求項22記載の方法。

【請求項25】 PPAR δ 活性を阻害する化合物の同定法であって、試験化合物のライブラリーからPPAR δ 活性を阻害する任意の化合物を選択することを含む方法。

【請求項26】 化合物がPPAR δ 蛋白の機能または活性を阻害するその能力により選択される請求項22ないし24のいずれか一つに記載の方法。

【請求項27】 化合物が細胞におけるPPAR δ の産生を阻害するその能力により選択される請求項22ないし25のいずれか一つに記載の方法。

【請求項28】 (1)マクロファージまたは他の細胞からの泡沫細胞の発生を予防するかまたは減少させるか、あるいは泡沫細胞を除去するか、または(2)プラーク形成に付随する血管疾患および／または血管の血栓性遮断を予防するかまたはその治療において有用である化合物、あるいはその化合物を産生するためのリード化合物として用いてもよい、または用いることができる化合物の同定法であって：

- (a) 適当な一次細胞集団または細胞系を選択し；
- (b) 泡沫細胞前駆体への分化を促進する炎症刺激または成長因子を細胞系に供給し；
- (c) 泡沫細胞前駆体に適当な濃度の脂肪酸を供給し；および
- (d) 該化合物の存在下または不在下で細胞における脂肪酸の蓄積を測定する；

工程を含む方法。

【請求項 29】 一次細胞集団が末梢単球およびマクロファージからなり、細胞系が白血球細胞系である請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】 白血球細胞系が単球またはマクロファージ様細胞系である請求項 29 記載の方法。

【請求項 31】 細胞が THP-1 または U937 細胞である請求項 30 記載の方法。

【請求項 32】 成長因子がホルボールエステルまたは GM-CSF である請求項 28 ないし 31 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 33】 ホルボールエステルが PMA である請求項 32 記載の方法。

【請求項 34】 脂肪酸が血清においてまたはリノール酸として供給される請求項 28 ないし 33 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 35】 脂肪酸蓄積が脂肪酸染色により測定される請求項 27 ないし 34 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 36】 請求項 21 ないし 35 のいずれか一つに記載の方法によって同定可能な化合物。

【請求項 37】 医薬において使用される請求項 36 記載の化合物。

【請求項 38】 請求項 36 に記載の化合物と医薬上許容される担体とを含んでなる医薬組成物。

【請求項 39】 PPAR δ 活性の阻害物質が、請求項 21 ないし 26 のいずれか一つに記載の方法により同定可能である請求項 1 ないし 12 のいずれか一つに記載の治療法。

【請求項 40】 マクロファージまたは他の細胞からの泡沫細胞の発生を予防するかまたは減少させるか、または泡沫細胞を除去するか、あるいはプラーク形成に付随する血管疾患および／または血管の血栓性遮断を予防するかまたは治療する方法であって、有効量の、請求項 27 ないし 33 のいずれか一つに記載の方法により同定可能な化合物を患者に投与することを含む方法。

【請求項 41】 PPAR δ 活性の阻害物質が、請求項 21 ないし 26 のい

いずれか一つに記載の方法により同定可能である請求項16ないし19のいずれか一つに記載の使用。

【請求項42】 マクロファージまたは他の細胞からの泡沫細胞の発生を予防するかまたは減少させるか、または泡沫細胞を除去するか、またはプラーク形成に付随する血管疾患および／または血管の血栓性遮断を治療または予防するための医薬の製造における請求項28ないし35のいずれか一つに記載の方法により同定可能である化合物の使用。

【請求項43】 本明細書に開示するようなプラーク形成に付随する血管疾患および／または血管の血栓性遮断の新規治療法または予防法。

【請求項44】 本明細書に開示するようなプラーク形成に付随する血管疾患および／または血管の血栓性遮断の予防または治療において有用な化合物の新規同定法。

【請求項45】 炎症性疾患の予防または治療法であって、患者に有効量のPPAR δ 活性の阻害物質を投与することを含む方法。

【請求項46】 マクロファージまたは他の細胞がアテローム性動脈硬化症の病理に関連するものである請求項1記載の方法。

【請求項47】 マクロファージまたは他の細胞がアテローム性動脈硬化症の病理に関連するものである請求2記載の方法。

【請求項48】 マクロファージがアテローム性動脈硬化症の病理に関連するものである請求項17記載の使用。

【請求項49】 マクロファージまたは他の細胞がアテローム性動脈硬化症の病理に関連するものである請求項22記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、治療法および医薬スクリーニング法に関し、特に、心血管医薬設計のための標的およびこの標的に向けられる化合物に関する。

【0002】

(背景技術)

脂質ホメオスタシスは正常な発育中および健康状態においては厳重に制御される；しかしながら、脂質ホメオスタシスの機能不全の結果、アテローム性動脈硬化症、肥満、糖尿病および癌などの疾患が発生する。脂質ホメオスタシスにおける重要なレギュレーターは、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）として知られる脂質センシング転写因子のファミリーを包含する。PPARは、構造的に多様な化学物質、例えば、脂肪酸、プロスタノイド、脂質低下剤、非ステロイド系抗炎症剤、インスリン増感剤および環境汚染物質により活性化されるステロイドホルモン／核受容体サブファミリーのメンバーである（1，2）。まず最初に説明されるPPARであるPPAR α は、肝臓における脂質代謝を制御し、脂質低下剤、例えばクロフィブレートにより活性化される（3，4）。PPAR α をコードする遺伝子が破壊されたマウスは、肝臓脂質を代謝し、排出する能力に欠陥を有し、脂質低下剤に反応して肝細胞は大きな脂質滴を蓄積する（4）。もう一つの形態、PPAR γ は、脂肪細胞の脂質刺激発生に必要とされる。PPAR γ はプロスタノイドの高親和性核受容体であり（5）、抗糖尿病薬、例えばロシグリタゾン（BRL49653）のチアゾリジンジオン基の薬理学的標的である（6）、国際特許出願公開番号WO94/05659（SmithKline Beecham PLC）。この遺伝子の遺伝的切除は致命的である（7）。

【0003】

PPARのもう一つの形態、PPAR δ の機能は未だ不明である。PPAR δ は、調査されたあらゆる組織において非常に低レベルで発現されることが報告されている（8）；しかしながら、本発明者らはPPAR δ が単球／マクロファージ系の細胞において選択的に発現され、ホルボールエステル誘発性マクロファージ

ジ分化中にPPAR γ と共に増加調節されることを観察した。PPAR δ は脂肪酸センサーであり、不飽和脂肪酸リノール酸およびオレイン酸により活性化され、これらの脂肪酸は単球の分化において重要なシグナリング化合物として関連している(9, 10, 11)。PPAR δ はフィブレート剤、例えば、クロロフィブレート、またはチアゾリジンジオン、例えば、BRL49653により活性化されない。

【0004】

WO97/28149 (Merck & Co. Inc.) は、哺乳動物において高密度リポ蛋白(HDL)血漿レベルを上昇させ、アテローム硬化性心血管疾患の予防、休止または進行の遅延に有用であるとされるPPAR δ 作用物質を記載している。

高脂肪食はアテローム性動脈硬化症の発生において主要な要因であることが知られており、アテローム性動脈硬化症の治療において用いられる多くの薬剤は脂質代謝を修飾する。脂質は、脂質滴で満たされた高度に活性化されたマクロファージであるマクロファージ由来の泡沫細胞においてアテローム性動脈硬化症の病理に物理的に関連する。これらの泡沫細胞はプラークとして知られる血管病巣において高濃度で存在し、これらは最終的に破裂し、その結果、血管の血栓性遮断に至る。この遮断は、臨床的には心臓発作、卒中または、末梢動脈疾患として表出する。本発明者らは、マウスマクロファージおよびヒトTHP-1単球系はホルボールエステルにより活性化される場合にPPAR δ を発現することを証明した。活性化されたTHP-1細胞は付着性になり、プラスチック製培養皿上に広がるようになる。適当な脂肪酸条件において、これらの細胞は、オイルレッドO (Oil Red O) 染色により検出されるように脂質で満たされ、泡沫細胞になる。

これらの細胞は、IL-1 β 、TNF α 、IGF-1、CD36、MCP-1等のインビボの泡沫細胞およびトロンボキサンシンターゼと関連する遺伝子を発現する。これらの細胞は脂質誘発性泡沫細胞形成のモデルを提供する。この蓄積は、抗アテローム性動脈硬化症剤候補、例えば、BRL49653により予防することができ、したがって、該薬剤の抗アテローム性動脈硬化症特性と該モデルが抗アテローム性動脈硬化症剤の同定に有用であることが示される。

【0005】

選択可能な発現ベクターを用いて、本発明者らは、PPAR δ アンチセンスRNAを発現するようにTHP-1細胞を修飾した。この細胞系は、培地中で正常に成長するが、ホルボールエステルで処理すると、この細胞系はそれ以上分化しない。ホルボールエステル処理後、この細胞系をトリパンブルー染色すると、細胞が死滅したことが明らかになる。したがって、PPAR δ 機能の阻害は、炎症刺激に対する応答を分化から死へとスイッチさせる。アテローム硬化性プラークは、高度に活性化されたマクロファージ由来の泡沫細胞で満たされ、炎症メディエーターの局所的濃度はプラーク内で非常に高い。理論に限定されないが、本発明者らは、例えば、アテローム病巣内の泡沫細胞におけるPPAR δ 機能の阻害は、プラーク内の自己破壊カスケードを開始するのに有用であると考ええる。炎症または壊死を起こさない泡沫細胞の制御された除去は、最近、BCL-Xに対するアンチセンス療法を用いてプラーク退縮を促進する有効な方法であることが証明された (Pollmanら、(1998) Nature Medicine 4, 222-227)。活性化されたマクロファージにおけるPPAR δ の標的化は、活性化された泡沫細胞の特定の表現型状態に依存した応答であるので高度に特異的である可能性が高いと本発明者らは考える。

【0006】

(発明の開示)

本発明の一の目的は、泡沫細胞発生を妨害するか、あるいは可能性のある泡沫細胞の制御された除去につながる化合物、または化合物のスクリーン法を提供することである。かかる化合物はプラーク退縮の促進、したがって、心臓病、卒中および血栓症の危険性を低減するのに有用であると考えられる。

本発明者らは、PPAR δ がマクロファージの活性化において重要な役割を果たし、PPAR δ を選択的に阻害することにより、泡沫細胞形成を予防することができることを見いだした。

本発明者らはさらに、PPAR γ 作用物質は脂質蓄積を阻害し、PPAR δ およびPPAR γ は泡沫細胞形成において互いに対抗することも見いだした。

【0007】

(発明を実施するための最良の形態)

本発明の第一の態様は、マクロファージまたは他の細胞からの泡沫細胞発生を予防または減少させるか、または泡沫細胞を除去する方法であって、前記マクロファージまたは他の細胞を有効量のPPAR δ 活性の阻害物質と接触させることを含む方法を提供する。

好適には、マクロファージまたは他の細胞はアテローム性動脈硬化症の病理に関連するものである。

該方法は、培養においてマクロファージおよび泡沫細胞の研究に関連して用いられてきたが、該方法は、インビボ、特にヒトまたは他の哺乳動物の体内での泡沫細胞発生の予防または減少、あるいは泡沫細胞の除去に特に適している。泡沫細胞は、脂質含有細胞、例えば、白血球、通常はマクロファージである。これらは内部化された脂質を有し、これらを細胞質滴として貯蔵し、このために細胞は光学顕微鏡において特徴的な泡状外観を呈する。

【0008】

本発明の第二の態様は、患者において、マクロファージまたは他の細胞からの泡沫細胞の発生を防止または減少させるか、あるいは泡沫細胞を除去する方法であって、該患者に有効量のPPAR δ 活性の阻害物質を投与することを含む方法を提供する。

好適には、マクロファージまたは他の細胞はアテローム性動脈硬化症の病理に関連するものである。

泡沫細胞に発達しうる細胞は、マクロファージだけでなく、平滑筋細胞も包含する。好ましくは、PPAR δ 活性の阻害物質は、マクロファージからの泡沫細胞の発生を予防または減少させるか、あるいはマクロファージ由来の泡沫細胞を除去するものである。より好ましくは、該方法は、マクロファージから泡沫細胞発生を予防または減少させる方法である。

【0009】

好ましくは態様に偏ることなく、また理論に限定されないが、マクロファージからの泡沫細胞の発生は、さまざまな疾患に関連し、PPAR δ 活性の阻害物質は、マクロファージからの泡沫細胞の発生を予防するか、または少なくとも所望の程度まで減少させる。泡沫細胞の発生に付随する疾患は、アテローム性動脈硬

化症、心疾患、卒中、末梢動脈疾患、および狭心症を包含するが、これに限定されない。

【0010】

該方法はさらに、再発狭窄症の予防およびアテロームの退縮にも用いることができる。

PPAR活性を阻害するとマクロファージの活性化が予防されるという知見は、該方法が炎症性疾患の治療にも用いることができることを示唆する。炎症性疾患の例は、慢性関節リウマチ、全身性硬化症、および狼瘡を包含する。炎症におけるPPAR δ の役割を支持して、PPAR δ 転写活性を遮断する非ステロイド系抗炎症剤サリダグは、PMA（ホルボールミリステートアセテート）誘発性表皮過形成および無PPAR δ マウスにおける炎症を防止することができない（Peters J Mら、（2000） Mol. And Cell Biol., 20, 5119-5128）。

【0011】

したがって、もう一つの態様において、本発明は、炎症性疾患の予防法または治療法であって、患者に有効量のPPAR δ 活性の阻害物質を投与することを含む方法を提供する。

アテローム性動脈硬化症の病理により起こる多種の疾患があり、それらは狭心症、冠心疾患、卒中、末梢動脈疾患、アルツハイマー病、血管性痴呆、全身性硬化症および網膜血管変性を包含する。

【0012】

本発明の第三の態様は、患者におけるプラーク形成に付随する血管疾患および/または血管の血栓性遮断の予防または治療法であって、該患者に有効量のPPAR δ 活性の阻害物質を投与することを含む方法を提供する。本発明の方法は、アテローム性動脈硬化症、冠心疾患、卒中または末梢心疾患の予防または治療に特に適していると考えられる。

本発明者らは、PPAR δ 活性の阻害は、細胞のPMA-刺激増殖を阻害することを証明した。したがって、本発明の第四の態様は、細胞の増殖を防止または減少させる方法であって、該細胞をPPAR δ 活性の阻害物質と接触させることを含む方法を提供する。PMAにより増殖するように刺激される細胞は、皮膚細

胞、結腸細胞、乳細胞および前立腺細胞を包含する。腫瘍発生におけるPPAR δ の役割の支持として、最近、非ステロイド系炎症剤が結腸由来の細胞においてPPAR δ 転写活性の遮断により抗癌活性を示し、アポトーシスを促進することが示された (He, T-Cら、(1999) Cell, 99, 335-343)。

【0013】

PPAR δ は腫瘍プロモータ、PMAの作用に関与する。

したがって、本発明の第五の態様は、患者における癌の治療法または予防法であって、該患者に有効量のPPAR δ 活性の阻害物質を投与することを含む方法を提供する。

本発明の方法は、皮膚癌に関連する使用に特に適している。

本発明の方法は、乳癌に関連する使用にも特に適している。

本発明の方法は、結腸の癌に関連する使用にも特に適している。

本発明の方法は、前立腺の癌に関連する使用にも特に適している。

【0014】

本発明の第六の態様は、患者におけるアルツハイマー病の治療または予防法であって、該患者に有効量のPPAR δ 活性の阻害物質を投与することを含む方法を提供する。

PPAR δ の阻害は、正常な加齢中に泡沫細胞を形成するグリア細胞により引き起こされる神経変性を予防する。これらの泡沫細胞は、高脂肪食により促進されると考えられる (Mato Mら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3269-3274 (1996))。

ApoE (アポリポプロテインE) はアルツハイマー病において防御を与えることが知られており、本発明者らは、実施例においてApoEが脂肪酸およびPPAR δ により阻害されることを示す。理論に限定されないが、本発明者らは、これが高脂肪食が痴呆を促進するメカニズムであり、このプロセスの拮抗作用が有用であると考え (Kalmijn Sら、Annals of Neurology 42, 776-782 (1997))。

【0015】

「有効量のPPAR δ 活性の阻害物質」なる語は、マクロファージまたは他の

細胞からの泡沫細胞の発生を予防または減少させるか、あるいは泡沫細胞を除去するのに有用な量、特に、疾患を予防する（無症候状態から症候性状態への進行を予防することを包含する）か、または疾患を臨床的に有用な程度まで治療する（症状の軽減およびその進行の遅延を包含する）のに有効な量を意味する。臨床的に有用である程度は、医師により容易に決定される。

【0016】

「PPAR δ 活性の阻害物質」なる語は、細胞、例えば、患者の細胞におけるPPAR δ 活性を減少させることができる任意の好適な阻害物質を意味する。PPAR δ 活性の阻害物質は、マクロファージ細胞またはマクロファージ細胞由来の泡沫細胞におけるPPAR δ 活性を阻害するものであるのが特に好ましい。「PPAR活性の阻害物質」なる語は、PPAR δ 作用物質の効果を遮断する化合物を包含する。

【0017】

PPAR δ 活性の阻害物質はPPAR δ に関して選択的であるのが好ましい。特に、該阻害物質はPPAR δ 活性の阻害において有効であるが、他のPPAR形態、例えば、PPAR α またはPPAR γ の活性を実質的に阻害できないのが好ましい。PPAR δ 活性の阻害物質が他のPPAR形態の活性を修飾しないのが好ましいが、分子がPPAR γ 活性の作用物質またはアクチベーターであるならば有利である。PPAR δ 活性の阻害物質が他のステロイドホルモン受容体ファミリーの受容体の活性を修飾しない場合も好ましい。「選択的」なる語は、該化合物が、もう一つのPPAR形態の活性の修飾におけるよりも、PPAR δ 活性の阻害において少なくとも10倍有効であることを意味する。好ましくは、これは少なくとも100倍さらに有効である。

【0018】

阻害物質は、細胞におけるPPAR δ の発現を予防するものであってもよい。「発現を防止する」とは、実質的に発現を予防するかまたは少なくともPPAR δ の発現のレベルを有用な程度まで減少させることを意味する。典型的には、細胞におけるPPAR δ の発現を予防する化合物は、核酸ベースの分子である。

実施例において示すように、本発明者らは、未翻訳領域の部分を含む全ヒ

トPPAR δ コーディング配列のアンチセンスを使用すると、マクロファージからの泡沫細胞の形成を阻害できることを示した。PPAR δ cDNAの小さい方の部分はアンチセンス剤として、特に、PPAR δ 蛋白の翻訳の開始に対応するものとして用いることができる。

【0019】

アンチセンス分子は、PPAR δ 配列を参照することにより設計することができ、そのヒトcDNA配列は、Schmidtら、(1992) Mol. Endocrinol. 6, 1634-1641に記載され、GenBank受入番号L07592である。

PPAR δ アンチセンス剤は、PPAR δ mRNAと結合し、好ましくはその翻訳を阻害する化学物質を包含する。「アンチセンス剤」なる語は、PPAR δ ゲノム配列とトリプレックスを形成することができ、遺伝子の選択的転写または翻訳を阻害できる核酸ベースの分子を意味する。

【0020】

アンチセンス分子はRNAであってもよく（この場合、これは、アンチセンス転写物を産生するように設計されたベクターから転写される）、あるいはDNAまたはDNA様分子、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドであってもよい。

ヒトPACクローンNo. 109F14の67886から139948位に対応するヒトゲノム配列の好適な部分からのアンチセンスRNAの過剰発現は、PPAR δ 活性の阻害において有効であると考えられる。PACクローンNo. 109F14は、HGMP Resource Centre, Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SB, UKから入手可能である。PPAR δ 遺伝子配列は、受入番号AL022721を有する。

【0021】

アンチセンスオリゴヌクレオチドはPPAR δ cDNAまたは遺伝子配列を参照することにより設計することができる。

オリゴヌクレオチドは、細胞内因性ヌクレアーゼにより分解または不活化される。この問題に対抗するために、天然に存在するホスホジエステル結合が別の結合で置換されている修飾された分子間結合を有するなど、修飾されたオリゴヌク

レオチドを用いることができる。例えば、Agrawalら、(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7079-7083は、オリゴヌクレオチドホスホルアミデートおよびホスホロチオエートを用いてHIV-1の組織培養物において阻害が増大することを示した。Sarinら、(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7448-7451は、オリゴヌクレオチドメチルホスホネートを用いてHIV-1の阻害が増大することを示した。Agrawalら、(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 7790-7794は、ヌクレオチド配列特異性オリゴヌクレオチドホスホロチオエートを用いた、初期感染および臨床的に感染した細胞培養物の両者においてHIV-1複製の阻害を示した。Leitherら、(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3430-3434は、オリゴヌクレオチドホスホロチオエートによるインフルエンザウイルス複製の組織培養における阻害を報告している。

【0022】

人工的な結合を有するオリゴヌクレオチドはインビボでの分解に対して耐性であることが証明されている。たとえば、Shawら、(1991) Nucleic Acids Res. 19, 747-750は、別の方法で未修飾のオリゴヌクレオチドは、あるキャッピング構造により3'末端で遮断されている場合、インビボでヌクレアーゼに対してさらに耐性になり、キャップされていないオリゴヌクレオチドホスホロチオエートはインビボで分解されないことを報告している。

オリゴヌクレオシドホスホロチオエートを合成するためのH-ホスホネート法の詳細な説明は、AgrawalおよびTang (1990) Tetrahedron Letters 31, 7541-7544に記載され、その内容は本発明の一部として参照される。オリゴヌクレオシドメチルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、ホスフェートエステル、架橋ホスホルアミデートおよび架橋ホスホロチオエートの合成は当業界で一般的である。たとえば、AgrawalおよびGoodchild (1987) Tetrahedron Letters 28, 3539; Nielsenら、(1988) Tetrahedron Letters 29, 2911; Jag erら、(1988) Biochemistry 27, 7237; Uznanskiら、(1987) Tetrahedron Letters 28, 3401; Bannwarth (1988) Helv. Chim. Acta. 71, 1517; CrosstickおよびVyle (1989) Tetrahedron Letters 30, 4693; Agrawalら、(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1401-1405参照 (その内容は本発明の一部として参照

される)。他の合成法または製造法も可能である。好ましい例において、オリゴヌクレオチドはデオキシリボ核酸 (DNA) であるが、リボ核酸 (RNA) 配列も合成し、適用することができる。

【0023】

本発明において有用なオリゴヌクレオチドは、内因性核溶解酵素による分解に耐性であるように設計される。オリゴヌクレオチドのインビボ分解により、長さが短くなったオリゴヌクレオチド分解生成物が生じる。かかる分解生成物は、非特異的ハイブリダイゼーションに関連しやすく、その完全長カウンターパートに対して有効である可能性は低い。したがって、体内での分解に耐性であり、標的とされる細胞に到達できるオリゴヌクレオチドを用いるのが望ましい。本発明のオリゴヌクレオチドは、1またはそれ以上の内部人工ヌクレオチド結合をもとのホスホジエステル結合に置換することにより、例えば、結合においてホスホネートを硫黄と置換することにより、分解に対してより耐性にすることができる。用いることができる結合の例は、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、スルホン、スルフェート、ケチル、ホスホロジチオエート、種々のホスホルアミデート、ホスフェートエステル、架橋ホスホロチオエートおよび架橋ホスホルアミデートを包含する。他のヌクレオチド間結合は当業界で公知であるので、かかる例は、限定的であるというよりも例示的である。例えば、Cohen, (1990) Trends in Biotechnology参照。ホスホジエステルヌクレオチド間結合に関して置換された1またはそれ以上のこれらの結合を有するオリゴヌクレオチドの合成は、当業界で一般的であり、混合ヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチドを製造する合成経路を包含する。

【0024】

オリゴヌクレオチドは「キャッピング (capping)」または5'または3'末端ヌクレオチド上の類似した基を組み入れることにより内因性酵素による伸長に対して耐性にすることができる。キャッピング用試薬は、Applied Biosystems Inc, Foster City, CAからAmino-Link IIとして市販されている。キャッピングの方法は、例えば、Shawら、(1991) Nucleic Acids Res. 19, 747-750 およびAgrawalら、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (17), 7595-7599

(その内容は、本発明の一部として参照される)に記載されている。

【0025】

ヌクレアーゼの攻撃に対して耐性であるオリゴヌクレオチドのさらに別の製造法は、Tangら、(1993) Nucl. Acids Res. 21, 2729-2735 (本発明の一部として参照される)に記載されているように、「自己安定化」することである。自己安定化されたオリゴヌクレオチドは、その3'末端でヘアピン状ループ構造を有し、ヘビ毒ホスホジエステラーゼ、DNAポリメラーゼIおよびウシ胎仔血清による分解に対して増大した耐性を示す。該オリゴヌクレオチドの自己安定化領域は、ハイブリダイゼーションにおいて、相補的核酸と干渉せず、マウスにおける薬物動態学的研究および安定性研究により、その直線状カウンターパートに関して、自己安定化オリゴヌクレオチドはインビボ持続性が増大している。

【0026】

本発明によれば、塩基対に特徴的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの固有結合特異性は、アンチセンス化合物のその意図されるインビボの場所に対する利用可能性を制限することにより向上され、さらに少ない使用量が可能になり、全身的影響が最小限に抑えられる。したがって、オリゴヌクレオチドを局所的に適用して、所望の効果が達成される。所望の場所でのオリゴヌクレオチドの濃度は、オリゴヌクレオチドを全身的に投与した場合よりもかなり高くなり、著しく低い総量で治療効果を達成することができる。局所的に高濃度のオリゴヌクレオチドにより、標的細胞の浸透が向上され、標的核酸配列の翻訳が有効に遮断される。

【0027】

薬剤の局所投与に適した任意の手段により、オリゴヌクレオチドを当該場所へ送達することができる。例えば、オリゴヌクレオチドの溶液を当該部位へ直接注射することができるか、または注入ポンプを用いた注入により送達することができる。オリゴヌクレオチドはさらに、所望の部位へ設置された場合に、周囲の場所中へオリゴヌクレオチドを放出させる移植可能な装置中に組み入れることもできる。

【0028】

オリゴヌクレオチドは、ヒドロゲル物質を介して投与されるのが最も好ましい

。ヒドロゲルは非炎症性および生分解性である。かかる物質の多くは現在公知であり、天然および合成ポリマーから製造されるものを包含する。好ましい例において、該方法は、体温より低い温度で液体であるが、体温または体温に近い温度でゲル化して、形状保持半固体ヒドロゲルを形成するヒドロゲルを利用する。好ましいヒドロゲルは、エチレンオキシド-プロピレンオキシド繰り返し単位を有するポリマーである。ポリマーの性質は、ポリマーの分子量およびポリマー中のポリエチレンオキシドとポリプロピレンオキシドの相対的割合（％）に依存する。好ましいヒドロゲルは、約10～約80重量％のエチレンオキシドおよび約20～約90重量％のプロピレンオキシドを含有する。特に好ましいヒドロゲルは、約70％のポリエチレンオキシドおよび30％のポリプロピレンオキシドを含有する。用いることができるヒドロゲルは、例えば、BASF Corp., Parsippany, NJからPluronicの商標で入手可能である。

【0029】

この例において、ヒドロゲルを冷却して液体状態にし、オリゴヌクレオチドを該液体中に混合して、1gのヒドロゲルにつき約1mgのオリゴヌクレオチドの濃度にする。結果として得られる混合物は、次に処理される表面上に、例えば、手術中噴霧または塗布するか、あるいはカテーテルまたは内視鏡検査法を用いることにより適用される。ポリマーが暖まるにつれ、凝固してゲルを形成し、ゲルの組成により決まる時間でオリゴヌクレオチドはゲルから周囲の細胞中へ拡散する。

【0030】

オリゴヌクレオチドは、リポソーム、マイクロカプセルおよび移植可能な装置を包含する商業的に入手可能であるかまたは科学文献に記載されている他のインプラントによって投与することができる。インプラントは、例えば、生分解性材料、例えば、ポリアンヒドリド、ポリオルトエステル、ポリアクチン酸およびポリグリコール酸ならびにそのコポリマー、コラーゲン、およびプロテインポリマー、または非生分解性材料、例えば、エチレンビニルアセテート（EVAc）、ポリビニルアセテート、エチレンビニルアルコール、およびその誘導体を、オリゴヌクレオチドを局所的に送達するために用いることができる。オリゴヌクレオ

チドは、重合または凝固する際に、溶解または溶媒蒸発技術を用いて材料中に組み入れることができるか、または機械的に該材料と混合することができる。一例において、オリゴヌクレオチドは、移植可能な装置、例えば、デキストランコーとされたシリカビーズ、ステント、またはカテーテルのコーティング中に混合されるかまたはコーティング上に適用される。

【0031】

オリゴヌクレオチドの量は、オリゴヌクレオチドの大きさおよび投与される目的によって変わる。一般に、範囲は、治療される組織の表面積に基づいて計算される。オリゴヌクレオチドの有効量は、オリゴヌクレオチドの長さおよび化学組成に多少依存するが、一般に組織表面積1平方センチメートルあたり約30から3000 μ gの範囲である。

オリゴヌクレオチドは治療および予防の両方の目的で全身的に投与することができる。オリゴヌクレオチドは任意の有効な方法、例えば、非経口（例えば、静脈内、皮下、筋肉内）または経口、経鼻あるいはオリゴヌクレオチドが患者の血流に達し、循環するような他の手段で投与することができる。全身的に投与されるオリゴヌクレオチドは局所投与されるオリゴヌクレオチドに加えて投与されるのが好ましいが、局所投与しなくても有用である。成人に対して1回の投与につき一般に約0.1～約10グラムの範囲の用量がこの目的に関して有効である。

【0032】

前記のアンチセンス剤に加えて、リボザイム、特にハンマーヘッドリボザイムを、PPAR δ cDNAまたはPPAR δ 活性の阻害物質として有用であると考えられる遺伝子配列に基づいて設計することができる。

標的に送達される核酸においてコードすることができるリボザイムは、CechおよびHerschlag、「Site-specific cleavage of single stranded DNA」米国特許第5180818号；Altmanら、「Cleavage of targeted RNA by RNase P」米国特許第5168053号；Cantinら、「Ribozyme cleavage of HIV-1 RNA」米国特許第5149796号；Cechら、「RNA ribozyme restriction endonucleases and methods」、米国特許第5116742号；Beenら、「RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction endonucleases and method

s」、米国特許第5093246号；およびBeenら、「RNA ribozyme porlymerases, dephosphorylases, restriction endoribonucleases and methods ; cleaves single-stranded RNA at specificc site by transesterification」、米国特許第4987071号（すべて、出典明示により本発明の一部とする）に記載されている。リボザイムの好適な標的は、転写因子、例えばc-fosおよびc-myc、ならびにbcl-2を包含する。Duraiら、(1997) Anticancer Res. 17, 3307-3312はbcl-1に対するハンマーヘッドリボザイムを記載している。

【0033】

本発明の方法において有用なリボザイムまたはアンチセンス化合物を発現する遺伝子構築物は容易に調製することができる。好適には、遺伝子構築物は、リボザイムまたはアンチセンス分子を標的細胞において送達し、発現するように適用されるものである。したがって、本発明は遺伝子療法を含む。

遺伝子療法は、例えば、Friedman, 1991により記載されているような一般的に認められている方法にしたがって行うことができる。発現調節エレメントに結合し、標的細胞の内部で複製可能なリボザイムまたはアンチセンス分子をコードする遺伝子を含むウイルスまたはプラスミドベクター（さらに詳細には、下記を参照）を調製する。好適なベクターは公知であり、例えば、米国特許第5252479号および国際特許出願公開番号WO93/07282 (Boehringer Ingelheim International GmbH) に開示されている。ベクターを次に患者に標的部位に局所的にあるいは全身的に注射する。トランスフェクションされた遺伝子が標的細胞のそれぞれのゲノム中に永久的に組み入れられないならば、処置は周期的に繰り返される。

【0034】

当業界で一般的な遺伝子転移システムは、本発明の遺伝子療法の実施において有用である。これらは、ウイルスおよび非ウイルス転移法を包含する。パポウイルス、例えば、SV40 (Madzakら、1992)、アデノウイルス (Berkner, 1992 ; Berknerら、1988 ; GorzigliaおよびKapikian, 1992 ; Quantinら、1992 ; Rosenfeldら、1992 ; Wilkinsonら、1992 ; Stratford-Perricaudetら、1990)、ワク

シニアウイルス (Moss, 1992)、アデノ関連ウイルス (Muzyczka, 1992; Ohiら、1990)、HSVおよびEBVを包含するヘルペスウイルス (Margolskee, 1992; Johnsonら、1992; Finkら、1992; BreakfieldおよびGeller, 1987; Freeseら、1990)、および鳥類 (BrandyopadhyayおよびTemin, 1984; Petropoulosら、1992)、ネズミ (Miller, 1992; Millerら、1985; Sorgeら、1984; MannおよびBaltimore, 1985; Millerら、1988)、およびヒト起源のレトロウイルス (Simadaら、1991; Helsethら、1990; Pageら、1990; BuchschacherおよびPanganiban, 1992) を包含する多くのウイルスが遺伝子転移ベクターとして用いられてきた。今日まで、ほとんどのヒト遺伝子療法は、無能化ネズミレトロウイルスに基づいてきた。レンチウイルスベースのベクターが好ましい。

【0035】

当業界で一般的な非ウイルス遺伝子転移法は、化学的技術、例えば、リン酸カルシウム共同沈降 (Grahamおよびvan der Eb, 1973; Pellicerら、1980) ; 機械的技術、例えば、マイクロインジェクション (Andersonら、1980; Gordonら、1980; Brinsterら、1981; ConstantiniおよびLacy, 1981) ; リポソームによる膜融合媒介転移 (Felgnerら、1987; WangおよびHuang, 1989; Kanedaら、1989; Stewartら、1992; Nabelら、1990; Limら、1992) ; および直接DNA取り込みおよび受容体媒介DNA転移 (Wolffら、1990; Wuら、1991; Zenkeら、1990; Wuら、1989b; Wolffら、1991; Wagnerら、1990; Wagnerら、1991; Cottonら、1990; Curielら、1991a; Curielら、1991b) を包含する。ウイルス媒介遺伝子転移は、リポソーム送達を用いた直接的インビボ遺伝子転移と組み合わせることができ、ウイルスベクターを腫瘍細胞に向かわせ、周りの不分割細胞中に向かわせない。別法として、レトロウイルスベクタープロデューサー細胞系を腫瘍中に注射することができる (Culverら、1992)。プロデューサー細胞の注射は、ベクター粒子の連続した供給源を提供する。この技術は、手術できない脳腫瘍を有するヒトにおける使用が認められている。

【0036】

他の好適な系は、Fengら、(1997) Nature Biotechnology 15, 866-870により記載されているレトロウイルス-アデノウイルスハイブリッド系、またはター

ゲッティングリガンド、例えば、適当な一本鎖Fvフラグメントを有するウイルス系を包含する。

生物学および物理的遺伝子転移法を組み合わせた方法において、任意の大きさのプラスミドDNAは、アデノウイルスヘキソン蛋白に特異的なポリリシン-接合抗体と組み合わせられ、結果として得られる複合体はアデノウイルスベクターに結合する。三分子複合体を用いて細胞を感染させる。アデノウイルスベクターは、結合したDNAが損傷を受ける前に、エンドソームの有効な結合、内部化、および分解を可能にする。

【0037】

リポソーム/DNA複合体は、直接的インビボ遺伝子転移を媒介することができることが示されている。標準的リポソーム調製において、遺伝子転移プロセスは非特異的であるが、局在化したインビボ取り込みおよび発現が、例えば直接的イン・サイチュ投与後の腫瘍沈積物において報告されている。

DNAを直接マクロファージに向かわせる遺伝子転移技術が好ましい。受容体媒介遺伝子転移は、例えば、DNA（通常、共有結合閉鎖超コイルプラスミドの形態）をポリリシンにより蛋白リガンドと接合させることにより達成される。リガンドは、標的細胞/組織型の細胞表面上の対応するリガンド受容体の存在に基づいて選択される。マンノース受容体は、マクロファージに対して特異的であり、DNA/マンノース接合体の特異的標的化が示されている。これらのリガンド-DNA接合体は、所望により血液中に直接注射することができ、標的組織に向けられ、ここでDNA-蛋白複合体の受容体結合および内部化が起こる。DNAの細胞内破壊の問題を克服するために、アデノウイルスと同時感染させて、エンドソームの機能を破壊することができる。

【0038】

さらに別の例において、化合物はPPAR δ 蛋白活性の活性を阻害するものである。

好適な化合物は、以下に記載する方法のいくつかを用いて選択することができる。

有効量のPPAR δ 活性の阻害物質を患者に任意の経路において、任意の好適

な処方において投与することができることは理解されるであろう。任意の投与方法または任意の処方の適合性は、阻害物質の性質を参照して当業者により容易に決定される。例えば、核酸ベースの阻害物質は、当業者に一般的な小分子ベースの阻害物質と異なる方法において処方され、投与される。

【0039】

本発明の方法において用いられる本発明の前記化合物またはその処方は、経口および非経口（例えば、皮下、静脈内、または筋肉内）注射を包含する任意の慣例法により投与することができる。治療法は、一回の投与または一定期間にわたって複数回投与することからなる。

典型的な用量は、 $0.01 \sim 20 \text{ mg/kg}$ の範囲内であると予想される。

本発明の化合物は単独で投与することができるが、1またはそれ以上の許容される担体と一緒に医薬処方とするのが好ましい。担体は、本発明の化合物と適合するという意味で「許容され」なければならず、受容者自身に対して有害であってはいけない。典型的には、担体は、無菌またはピロゲンを含まない水または食塩水である。

【0040】

処方は、単位剤型にされるのが好都合であり、調剤分野で一般的な任意の方法により調製することができる。かかる方法は、活性成分（本発明の化合物または本発明の方法において使用される化合物）と1またはそれ以上の補助成分を構成する担体を組み合わせる工程を含む。一般に、処方は、活性成分を液体担体または微細に分割された固体担体あるいは両者と均一に、よく混合して会合させ、続いて必要ならば生成物を成形することにより調製される。

経口投与に適した本発明による処方は、それぞれが所定の量の活性成分を含む別個の単位、例えば、カプセル、カシエ剤または錠剤として；散剤または顆粒剤として；水性液体または非水性液体中溶液剤または懸濁剤として；あるいは水注油液体乳剤または油中水液体乳剤として提供することができる。活性成分はまた、ポーラス、砥剤またはペーストとして提供することもできる。

【0041】

錠剤は、所望により1またはそれ以上の補助成分と共に打錠または成形するこ

とにより製造される。圧縮錠剤は、適当な機械で、所望により結合剤（例えば、ポビドン、ゼラチン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース）、滑沢剤、不活性希釈剤、保存剤、崩壊剤（例えば、デンプングリコール酸ナトリウム、架橋ポビドン、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム）、界面活性剤または分散剤と混合されてもよい、易流動性形態、例えば粉末または顆粒の活性成分を圧縮することにより調製することができる。成形錠剤は、適当な機械で、不活性液体希釈剤で湿らせた粉末化合物を成形することにより調製することができる。錠剤は、所望により被覆またはスコアされてもよく、例えば、所望の放出特性を提供するためにさまざまな割合のヒドロキシプロピルメチルセルロースを用いて、活性成分を遅延放出または制御放出させるように処方することができる。

【0042】

非経口投与に適した処方は、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤および処方を意図する受容者の血液と等張にする溶質を含む水性および非水性滅菌注射溶液；ならびに懸濁化剤および増粘剤を含んでもよい水性および非水性滅菌懸濁液を包含する。処方は、単位剤型または複数用量容器、例えば、密封されたアンプルおよびバイアル中で提供され、使用直前に、滅菌液体担体、例えば注射用水を添加するだけでよいフリーズドライ（凍結乾燥）状態において保存することができる。処方箋に応じて処方された注射溶液および懸濁液は、すでに記載された種類の滅菌粉末、顆粒および錠剤から調製することができる。

【0043】

好ましい単位剤型処方、活性成分の一日量または単位、準一日用量またはその適当なフラクションを含むものである。

前記の具体的な成分に加えて、本発明の処方、問題となる処方の種類に関する当業界で慣例の他の薬剤を含むことができること、例えば、経口投与に適したものは、フレーバーを含むことができることは理解されるであろう。

本明細書に記載された処方、常法、例えば、英国薬局方および米国薬局方、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.)、Martindale The Extra Pharmacopoeia (London, The Pharmaceutical Press) に記載されている方法を用いて行うことができる。

【0044】

本発明の治療法は、ヒトを包含する任意の哺乳動物を治療するために用いることができる。したがって、該方法は、例えば、ネコおよびイヌなどのヒトに飼われている動物、またはウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギおよびブタなどの家畜動物、あるいは他の商業的に重要な哺乳動物を治療するために用いることができる。PPAR δ 活性の阻害物質が核酸ベースの分子である場合、これは哺乳動物のPPAR δ 遺伝子またはcDNAを参考にして設計されると理解される。

治療される患者はヒト患者であるのが好ましい。

本発明のさらに別の例は、医薬において用いられるPPAR δ 活性の阻害物質を提供する。

【0045】

阻害物質は、包装され、医学において使用するために包装され、提供される。特に、これは、アテローム性動脈硬化症の治療、または心疾患の治療または卒中の治療または末梢動脈疾患の治療またはプラーク形成に付随する血管疾患の治療または血管の血栓性遮断の治療またはアルツハイマー病の治療または癌の治療において使用するために包装され、提供される。

本発明のさらに別の態様は、PPAR δ 活性の阻害物質と医薬上許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。

【0046】

本発明のさらに別の態様は、患者においてマクロファージまたは他の細胞からの泡沫細胞の発生を予防または減少させるか、あるいは泡沫細胞を除去するための医薬の製造におけるPPAR δ 活性の阻害物質の使用；プラーク形成に付随する血管疾患および／または血管の血栓性遮断の予防または治療用医薬の製造におけるPPAR δ 活性の阻害物質の使用；癌の治療または予防用医薬の製造におけるPPAR δ 活性の阻害物質の使用；およびアルツハイマー病の治療または予防用医薬の製造におけるPPAR δ 活性の阻害物質の使用を提供する。

好適には、マクロファージまたは他の細胞は、アテローム性動脈硬化症の病理に関与するものである。

【0047】

本発明以前は、PPAR δ 活性の阻害物質は、特に医薬において有用ではないとされていた。本発明は、PPAR δ 活性を阻害する化合物、特にマクロファージまたは泡沫細胞においてPPAR δ 活性を阻害するものを同定する方法も包含する。このように同定された化合物は、それ自身、医療において有用であるか、または医学上有用な化合物にさらに発展するリード化合物として有用である。本発明のこれらの方法、またはかかる方法を行うための手段は、「薬剤スクリーニング法」または「薬剤スクリーニング分析法」とであるとみなされる。

【0048】

本発明の一態様は、医療において有用である化合物を製造するためのリード化合物として有用である化合物を同定するための方法であって、PPAR δ 活性を阻害する化合物を選択することを含む方法を提供する。典型的には、該方法は、試験化合物のライブラリー中に存在する多くの試験化合物をスクリーンすることを含む。したがって、本発明のさらに別の態様は、PPAR δ 活性を阻害する化合物を同定する方法であって、試験化合物のライブラリーからPPAR δ 活性を阻害する任意の化合物を選択することを含む方法を提供する。

【0049】

前記方法は、細胞におけるPPAR δ 遺伝子発現またはPPAR δ 蛋白の産生（すなわち、翻訳）を阻害するか、またはPPAR δ 蛋白活性を阻害する化合物を選択するために用いることができる。

好適な分析様式は当業者には一般的であり、そのうちのいくつかを実施例3においてさらに詳細に記載する。

PPAR δ 遺伝子発現を阻害する化合物の同定に関して、好ましい具体例は、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼなどのレポーター遺伝子と操作可能に結合したPPAR δ 遺伝子プロモーターを用いることを含む。細胞におけるレポーター遺伝子の発現は、試験化合物の存在下または不在下で測定することができる。レポーター遺伝子の発現を選択的に減少される試験化合物は、PPAR δ 遺伝子の発現を阻害または減少させるのに有用である化合物として選択され、したがってPPAR δ 活性が阻害される。

【0050】

PPAR δ 蛋白活性を阻害する化合物に関連して、阻害することが望ましい具体的な活性は、PPAR δ 蛋白がその制御下で転写により遺伝子を活性化させる能力である。したがって、一例において、レポーター遺伝子、例えば、前記のものは、PPAR δ の制御下のプロモーターまたはエンハンサー配列と操作可能に結合される。PPAR δ の制御下にある遺伝子は、CYP4A6、アシルCoAオキシダーゼおよびリポ蛋白質リパーゼを包含し；したがって、これらの遺伝子のプロモーターは本発明のこの例において有用であると考えられる。ヘテロロガスなプロモーター、例えば、HSVチミジンキナーゼ遺伝子から得られるものと結合したこれらの遺伝子由来の合成エンハンサーエレメントも、本発明のこの例において有用である。プロモーターまたはエンハンサー／レポーター遺伝子を含む遺伝子構築物は、好適な細胞、例えば単球またはマクロファージ細胞中にトランスフェクトされる。COS-1またはCV-1細胞（いずれもアフリカミドリザル腎臓細胞のサブライン）も用いることができる。PPAR δ をコードする遺伝子構築物も細胞中にトランスフェクトされ、レポーター遺伝子の発現を阻害する試験化合物の能力を評価する。特に好ましい例において、トランスフェクトされた細胞を公知のPPAR δ 作用物質、例えばWO97/28149の9ページに開示されている化合物F（以下、化合物Fと称する）とともに試験化合物との組合せにおいてインキュベートし、作用物質の作用を妨害する試験化合物の能力を定量する。レポーター遺伝子の発現を減少または阻害する化合物をさらに研究するために選択する。

【0051】

さらに別の例において、実施例3に記載するようにCALRA（コアクチベーター／受容体／リガンド相互作用分析）を用いることができる。これらの分析法は、PPAR δ の好適なリガンドの存在に対するコレセプターの結合の依存性に依存する。CARLA分析において、作用物質が存在し、作用物質の作用を妨害する試験化合物の能力を評価する。

本発明の方法により選択することができる特に好ましい化合物は、転写的に無益な方法でPPAR δ のリガンド結合部分と結合し、これによりPPAR δ の作用リガンドの作用を防止するものである。

【0052】

本発明の一例において、化合物がPPAR δ 活性の阻害物質であるか拮抗物質であるかを決定する前にPPAR δ と結合する化合物を同定するために「予備スクリーニング」工程を行う。受容体リガンド結合分析は当業界において一般的であり、当業者は容易に工夫し、実行することができる。

さらに好ましい例において、本質的に下記の泡沫細胞分析である「予備スクリーニング」工程を行うことができる。したがって、このようにして、マクロファージまたは他の細胞からの泡沫細胞の発生の予防または減少あるいは泡沫細胞の除去において活性であり、PPAR δ の阻害物質である化合物を選択することができる。

【0053】

好適には、マクロファージまたは他の細胞は、アテローム性動脈硬化症の病理に関連するものである。

さらに別の例において、PPAR阻害物質は、PPAR δ とコアクチベーター、例えばSRC-1との相互作用をモニターするためのツーハイブリッド法 (Two-hybrid approach) を用いて同定することができる。この場合において、PPAR Δ (またはその機能的部分) をDNA結合蛋白 (例えば、GAL4のDNA結合領域) と融合させ、コアクチベーターまたはその機能的部分 (例えば、SRC-1) をトランス活性化蛋白 (例えば、VP16のトランス活性化領域) と融合させる。DNA結合蛋白依存性 (例えば、GAL-依存性) プロモーターの制御下でこれらの融合物の両方を発現し、一体化したレポーター遺伝子 (例えば、 β -ガラクトシダーゼ) を有する酵母が生じる。

【0054】

酵母をPPAR δ 作用物質および広範囲におよぶ試験化合物の存在下で成長させる。低 β -ガラクトシダーゼ活性を有する培養物は、PPAR δ 拮抗物質の存在を示す。

前記のような化合物を同定する方法は、(1) マクロファージからの泡沫細胞の発生を予防または減少させるかまたは泡沫細胞を除去する、(2) プラーク形成に付随する血管疾患および/または血管の血栓性遮断の予防またはその治療に

有用である、(3) 癌を予防するかまたは癌の治療において有用である、あるいは(4) アルツハイマー病を予防するかまたはその治療において有用である化合物として、または化合物を製造するためのリード化合物として用いることができる化合物の同定において有用である。

【0055】

本発明のさらなる態様において、化合物をPPAR δ 活性を阻害または減少させる能力について選択した後、例えば、その化合物がマクロファージまたは他の細胞からの泡沫細胞の発生を予防するかまたは減少させるか、あるいは泡沫細胞を除去するかどうか、プラーク形成に付随する血管疾患および/または血管の血栓性遮断を予防するかまたはその治療において有用であるかどうか、あるいは癌を予防するかまたはその治療において有用であるかどうか、あるいはアルツハイマー病を予防するかまたはその治療において有用であるかどうかを測定するために、さらなるスクリーニングに用いるのが都合がよい。

【0056】

好適には、マクロファージまたは他の細胞は、アテローム性動脈硬化症の病理に関連するものである。

これらの特性を決定するためのスクリーニング法は、この用途（マクロファージからの泡沫細胞発生に関して）から公知であるかまたは当業界で公知である。

他の有用なスクリーン法を選択された化合物に関して、例えばその溶解度、薬理学的特性および薬剤代謝特性を決定するために行うことができる。同様に、PPAR δ 活性の阻害に関して化合物の選択性を決定するためにスクリーンを行うことができる。例えば、特定の化合物がもう一つのPPAR体の活性を修飾するかどうかを決定するためにスクリーンを行うことができる。典型的には、他のPPAR体の活性を実質的に修飾しない化合物が選択されるのが好ましい。しかしながら、選択される化合物がPPAR δ 活性を阻害するが、PPAR γ 活性の作用物質またはアクチベーターであるならば有利である。同様に、選択される化合物が、PPAR δ 活性を阻害するが、PPAR α 活性のアクチベーターまたは作用物質であるならば有利である。

【0057】

本発明のスクリーニング法において選択される化合物は、「薬剤様化合物」であってよい。

「薬剤様化合物」なる語は、当業者には一般的であり、例えば、医薬における活性成分として、医療において使用するのに好適になるような特性を有する化合物を意味する。したがって、例えば、薬剤様化合物は、有機化学の技術（分子生物学または生化学の技術はあまり好ましくない）により合成することができ、小さな分子であるのが好ましく、分子量が5000ダルトンより小さく、水溶性である分子である。薬剤様化合物は、さらに、特定の蛋白と選択的に相互作用する特性を示し、生体利用可能性および／または標的細胞膜を透過可能であるが、これらの特性は必須ではない。

【0058】

「リード化合物」なる語は、同様に当業者には一般的であり、化合物それ自身は薬剤としての使用に適していないが（例えば、その意図する標的に対してわずかにしか有効でない、その作用において非選択的、不安定、難溶性、合成が困難、または生体利用性が低いため）、より望ましい特性を有する他の化合物を設計するための出発点を提供する化合物を意味する。

「薬剤様化合物」および「リード化合物」なる語は、典型的には、例えば、比較的大きな核酸ベースの分子ではなく、比較的小さな有機分子を意味する。それにも関わらず、本発明の多くのスクリーニング法は、核酸ベースの分子、特にPPAR δ 遺伝子の発現またはPPAR δ 蛋白の翻訳を阻害するものを同定するのに適していると考えられる。

薬剤開発の分野において一般的なように、スクリーンにおいて見いだされたリード化合物は、修飾することができ、修飾された化合物はその活性を決定するためにスクリーンされる。

本発明は、食用脂肪誘発性泡沫細胞形成のインビボモデルおよび有用な化合物の同定におけるその使用にも関する。

【0059】

第一工程における泡沫細胞形成は、二工程プロセスであり、ここに、細胞はPMAなどの炎症刺激を受けることにより、または適当な成長因子、例えば、GM

CSF（顆粒球マクロファージコロニー刺激因子）と接触させることにより、泡沫細胞前駆体に変換される。第二工程において、前駆体細胞は適当な濃度の脂肪酸の存在下で泡沫細胞になる。

したがって、本発明のさらなる態様は、（１）マクロファージまたは他の細胞、好適にはアテローム性動脈硬化症の病理に関連するマクロファージまたは他の細胞からの泡沫細胞の発生を予防または減少させるか、または泡沫細胞を除去する、（２）プラーク形成に付随する血管疾患および／または血管の血栓性遮断を予防するかまたはその治療において有用である化合物または化合物を製造するためのリード化合物として用いることができる化合物を同定する方法であって：

- （a）適当な一次細胞集団または細胞系を選択し、
- （b）該細胞系に、泡沫細胞前駆体への分化を促進する炎症刺激または成長因子を供給し、
- （c）該泡沫細胞前駆体に適当な濃度の脂肪酸を供給し、および
- （d）該化合物の存在下または不在下での該細胞における脂肪酸の蓄積を測定する

工程を含む方法を提供する。

【0060】

好適には、一次細胞集団または細胞系は、アテローム性動脈硬化症の病理に関連する。

セルタイプは任意の好適なセルタイプであってよい。好ましくは、白血球細胞である。白血球細胞系がマクロファージまたはマクロファージ前駆体細胞系であるのが特に好ましい。

典型的には、細胞は、THP-1またはU937である。THP-1はECC細胞寄託番号85011440として入手可能であり、U937はECC細胞寄託番号8801201として入手可能である。しかしながら、任意の好適な白血球細胞を用いることができるが、単球またはマクロファージ様細胞を用いるのが好ましい。THP-1細胞は、「単球様」であり、ホルボールエステル（PMA）によりマクロファージ様細胞に分化させることができる。

【0061】

「炎症刺激を細胞に供給する」とは、細胞の泡沫細胞への刺激を促進する任意の好適な炎症刺激を供給することを包含する。

「泡沫細胞への分化を促進する成長因子」とは、任意の好適な成長因子、例えば、GMCSFを包含し、本発明に関しては、PMAを包含する。PMAまたは機能的に同等なホルボールエステルが好ましい。

典型的には、ホルボールエステルはPMAであるが、細胞の分化を促進する任意の好適なホルボールエステルであってもよい。

典型的には、PMAは0.1~10 ng/mlの濃度で用いられる。

【0062】

脂肪酸は、細胞が成長する血清中で細胞に供給することができる。本発明者らは、Gibco BRLから得られる不活化ウシ胎仔血清は脂質蓄積のバックグラウンドが低く、Sigmaから得られるControlled Process Serum Replacement (CPSR-3)を用いて高レベルの脂質蓄積が達成されることを見いだした。別法として、好適な濃度において供給してもよい（例えば、成長培地に添加することによる）。好適な脂肪酸としては、リノール酸を包含する18~22の鎖長の一または多不飽和脂肪酸が挙げられる。好適には、脂肪酸は、10~100 μMの濃度で供給される。

【0063】

細胞における脂肪酸の蓄積は、任意の好適な方法を用いて測定することができる。特に都合の良い方法は、脂肪酸染色、例えば、その場で用いることができ、プレートリーダーを用いて読みとられるNile RedまたはOil Red Oの使用を含む。脂肪酸の蓄積を測定するために用いることができる他の方法としては、TLC、HPLC、およびLC-MSが挙げられる。

試験化合物の存在下または不在下での細胞中の脂肪酸の蓄積を評価し、細胞中の脂肪酸の蓄積の減少につながる化合物をさらに試験するために選択する。

【0064】

細胞はマルチセル培養皿（例えば、64セル培養皿）中で成長させることができ、脂質染色を、例えば光学的にマイクロタイタープレートリーダーで定量化することができるので、スクリーニング法は高処理量スクリーニング用に容易に自

動化することができる。

本発明のさらに別の態様は、本発明のスクリーニング法により同定可能な化合物；医療において使用するために本発明の方法により同定可能な化合物；およびさらに医薬上許容される担体を含むかかる化合物の医薬組成物を提供する。

本発明のスクリーニング法により同定され、同定可能である化合物は、本発明の治療法において有用であると考えられる。

【0065】

本発明を以下の記載、実施例および図面を参照して、より詳細に記載する；ここに、

図1はTHP-1細胞におけるPPARの発現を示す。PPAR α および δ mRNAに関するRNAse発現分析を、マウスおよびヒト肝臓ならびにいくつかのヒト細胞系からの全RNAに関して行った。Huh7細胞系は、ヒト肝臓(>1%アクチン)から単離された全RNAと比較した場合の同量のPPAR δ (黒)および α (白) mRNAを含むヒト肝臓細胞系である。Huh7およびヒト肝臓はいずれも脂質代謝およびPPRE含有レポーター構築物からの転写における増加の点でペルオキシソーム増殖因子に反応しない。単球細胞系、例えば、U937およびTHP-1細胞は、比較的高レベルのPPAR δ (5-6%アクチン)を発現する。他のヒト組織を、結腸、卵巣、睾丸、腎臓、副腎などの α および δ 発現に関して分析した。すべての場合において、発現レベルはアクチン1%未満であった(データは示さない)。しかしながら、これらの複雑な組織の個々の細胞成分は、有意のレベルのこれらの受容体を発現する可能性がある。

【0066】

図2は、THP-1細胞におけるアテローム発生性遺伝子発現を示す。THP-1細胞から得られる全RNAを、アテローム発生プロセスに関連するさまざまな遺伝子産物の発現に関して、RT-PCRにより分析した。正常な成長状態におけるTHP-1細胞(-PMA)、ホルボールエステル処理(+PMA)および100 μ Mリノール酸の存在下でのホルボールエステル処理後の接着性THP-1細胞の分析のエチジウムブロミド染色されたアガロースゲルを示す。すべてのプローブは、イントロン/エクソン境界を越えるように設計され、ゲノムDN

Aを増幅しなかった。

【0067】

図3はロシグリタゾンにより阻害される泡沫細胞の形成を促進する脂肪酸およびレキシノイドを示す。レキシノイドは9-シス-レチノン酸に関して特異的な薬剤であり、Ligand Pharmaceutical compound, LG100268である (Mukherjee Rら、(1997) Nature 386, 407-410)。ロシグリタゾンはSmithKline Beechamにより製造され、AvandiaおよびBRL 49653としても知られている。

【0068】

A 脂肪酸は泡沫細胞形成においてレキシノイドと共同する

THP-1細胞を5 ng/mlのPMAおよびDMSO (ジメチルスルホキシド; 0.5%)、リノール酸 (30 μ M)、LG100268 (5 μ M) およびLG100268を含むリノール酸で処理した。処理を3日間続け、細胞を0.66 Mパラホルムアルデヒド中に固定し、Oil Red Oの飽和溶液で染色し、続いてヘマトキシリンで対比染色した。リノール酸またはLG100268のいずれかでの処理に関して、脂質の蓄積の増加が観察された。両化合物の添加により、脂質蓄積に関してさらに効果が得られる。

B ロシグリタゾンは脂質クリアランスを促進する

PMA処理されたTHP-1細胞を、20 μ MのBRL 49653で3日間処理し、前記のように脂質蓄積に関して染色した。

【0069】

図4は、ロシグリタゾンはTHP-1細胞における遺伝子発現を調節することを示す。

A IL-1 β 発現はロシグリタゾンにより減少する。

PMA処理THP-1細胞 (+PMA)、PMAおよびリノール酸処理細胞 (+PMA+FA)、ならびにPMAおよびBRL 49653処理細胞 (+PMA+BRL) におけるインターロイキン1 β mRNAレベルのRNAse保護分析。アクチン標準化シグナルも示す。

B TNF α 発現はロシグリタゾンにより減少する。

対照THP-1細胞 (-PMA)、PMA処理細胞 (+PMA)、PMAおよ

びリノール酸処理細胞 (+PMA+FA)、ならびにPMAおよびBRL 49653 処理細胞 (+PMA+BRL) におけるTNF α mRNAレベルのRNAse保護分析。アクチン標準化シグナルも示す。

C CD36発現はロシグリタゾンにより増大する。

対照THP-1細胞 (-PMA)、ならびにPMAおよびBRL 49653 処理細胞 (+PMA+BRL) におけるCD36抗原発現の蛍光活性化細胞選別 (FACS) 分析。処理を48時間50 μ MのBRL 49653で行った。細胞を培養皿から掻き取り、固定し、FITC (蛍光イソチオシアネート) 接合CD36抗体 (Coulter Immunotech) とともにインキュベートした。Coulter EPIC V細胞ソーターを用いてFACS分析を行った。

【0070】

図5は、PPAR δ を構成的に発現する細胞系の発生を示す。ヒトPPAR δ の全コーディング配列を真核細胞発現ベクターpCLDN中にサブクローンした (Brightly D Wら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7802-7805 (1991))。結果として得られるプラスミドを、修飾DEAE-デキストラン法を用いてTHP-1細胞中にトランスフェクションした (Fujitaら、(1986) Cell 46, 401-407)。死んだ細胞を除去するために厳密に洗浄しながら、1mg/mlのG418および10%THP-1を含有する条件培地中に細胞を維持した。これらの細胞の死が停止するまで続け、健全な成長が観察された。本発明者らは、pCLDN (空ベクター) pCLDNPPAR δ 、pCLDNPPAR δ AS、pCLDNPPAR α およびpCLDNPPAR α ASのそれぞれ6ラインを得た。これらの細胞系はすべて本質的に成長および生存性において同じであった。選択培地中でPPAR δ 細胞系に関して初期分化実験を行った。これらは空ベクター対照系を包含するすべての構築物に関して陰性であった。すべてトリパンブルー取り込みを示したPPAR δ アンチセンス系以外、PMA処理後すべての構築物は生存していた。空ベクター対照系がPMAに対して親対照と同様に反応するまで、細胞をG418なしで培養した。これにより、pCLDNPPAR δ 系はすべて同様に分化したが、pCLDNPPAR δ AS系はすべて分化しなかったことが明らかになった。

【0071】

RNAおよび蛋白をPPAR δ センス細胞系から調製し、RNAse保護によりPPAR δ mRNAに関して(B)およびウェスタンブロッティングによりPPAR δ 蛋白に関して(C)分析した。発現された6つの系はすべてPPAR δ mRNAにおいて親細胞系よりも10以上増大した。高レベルのPPAR δ 蛋白は、デルター-1およびデルター-2で示される系においてみられた。他の4つの系はウェスタンブロッティングにより分析しなかった。その後の実験はすべてこれらの系に関して行った。

【0072】

図6は、PPARデルタ過剰発現は泡沫細胞形成を促進することを示す。

A 親THP-1細胞およびpCLDNPPAR δ 細胞を5 ng/mlのPMAおよびDMSO(0.5%)またはBRL49653(50 μ M)で処理した。処理を3日間続け、細胞を0.66Mパラホルムアルデヒド中に固定し、Oil Red Oの飽和溶液で染色し、ヘマトキシリンで対比染色した。その後の実験により、BRL49653作用がサブミクロモル濃度で有効であることが示された。

【0073】

図7は、脂肪酸流出が、活性化PPARデルタ過剰発現細胞において阻害されることを示す。

A 脂肪酸取り込み

2 mlの培地中1000000個の細胞を5 μ Ciの 3 H-オレイン酸とともに一夜100 μ Mのリノール酸とともにまたはリノール酸なしで(それぞれ、HIGH FATおよびLOW FAT)インキュベートした。細胞を次にペレット化し、洗浄し、標識された脂肪酸を含まない新しい培地中に再懸濁化した。培地および洗浄された細胞のアリコートのシンチレーションカウンティングにより取り込み(%)を測定した。すべての分析は三重複試験において行った。

B 脂肪酸流出

洗浄された細胞をさらに50時間インキュベートし、放射能の放出を時間をかけてモニターした。高脂肪における親細胞は◇で示し、低脂肪におけるものは□で示す。高脂肪におけるPPAR δ 過剰発現細胞は△で示し、低脂肪におけるも

のは○で示す。

C PMA活性化細胞の脂肪酸流出

細胞をPMAで処理し、放射標識されたオレイン酸とともに前記のようにインキュベートした。接着性細胞を洗浄し、これらの細胞からの放射能の放出を時間をかけて測定した。親細胞系(□)は、PPAR δ 過剰発現細胞(◇)よりも高レベルの放射能放出を示す。

【0074】

図8は、ApoE遺伝子発現はPPAR δ を介して脂肪酸により調節されることを示す。

全RNAを、PMA(THP-1)またはPMAおよびリノール酸(THP-1+FA)で処理した親THP-1細胞、ならびに未処理PPAR δ 過剰発現細胞系(DELT A)から調製した。cDNAをこれらのRNAサンプルから調製し、TAQMAN法を用いてApoE配列に関してcDNAを分析した。示された結果は、 β -アクチン発現について標準化された相対発現であり、エラーバーは重複サンプルにおける標準偏差を表す。

【0075】

図9は、PPAR δ の阻害が泡沫細胞形成を防止することを示す。細胞を一夜5ng/mlのPMAで処理し、分化(培養皿への付着)および生存性(トリパンブルー排除)に関して採点した。親THP-1細胞およびPPAR δ 過剰発現細胞(Sense)はPMAの存在下でよく分化した。しかしながら、PPAR δ アンチセンス発現細胞(Anti-sense)は全く分化せず、トリパンブルーに対して高度に透過性であった。これらのPPAR δ アンチセンス細胞は、PMAの不在下で高い生存率で正常に成長する。

【0076】

図10は、PPAR δ の死の防御はPKCの下流でないことを示す。親およびPPAR δ アンチセンス細胞をPMAおよびPKC活性の阻害物質(Bis)およびPLA2活性の2つの阻害物質(OBAAおよびメバクリン)と共にインキュベートした。これらの阻害物質は、特異的阻害に関する依然の研究において用いられた濃度で取り込まれた。

BisはビスインドイルマレアミドIであり、Sigmaから入手可能である。OBAAは3-(4-オクタデシル)ベンゾイルアクリル酸であり、Calbiochemから入手可能である。メバクリンは、6-クロロ-9-[(4-ジエチルアミノ)-1-メチルブチル]アミノ-2-メトキシ-アクリジンであり、Calbiochemから入手可能である。

すべての阻害物質は、親THP-1細胞の分化を防止した(A)。これにより、ホルボールエステルの作用におけるPKCの役割が確認された。PLA2阻害物質の作用は、マクロファージ分化の新しい面を明らかにするであろう。しかしながら、本発明者らがトリパンプルー排除によりこれらの生存性を調べた(B)際に、本発明者らは、これらはPPAR δ アンチセンス細胞系(黒)のPMA-誘発性「死」を遮断しないことを見いだした。メバクリンのみが親細胞(白)において毒性の徴候を示した。

【0077】

図11は、脂質の蓄積がPPAR δ の作用物質、化合物Fにより促進されることを示す。

図12は、化合物F、PPAR δ 作用物質が、THP-1グリア細胞からのマクロファージ泡沫細胞形成を促進することを示す。

図13は、化合物Fが一次ヒト単球からのマクロファージ泡沫細胞形成を促進することを示す。

図14は、PPAR δ により促進されるグリア細胞における脂質の蓄積を示す。

図15は、化合物Fが前立腺癌細胞系の分化を刺激することを示す。

【0078】

泡沫細胞形成におけるPPAR δ の役割
組織培養

ヒトグリオ芽腫星状細胞腫U373細胞を、10% v/v 熱不活化ウシ胎仔血清(GibcoBRL, Paisley, Scotland)、ペニシリン(5000 IU/ml)(GibcoBRL, Paisley, Scotland)およびストレプトマイシン(5000 μ g/ml)(Gibco, Paisley, Scotland)で補足したRPMI 1640培地中で成長させた。

培養物を37℃および5%CO₂で成長させ、100%融合に達したときに継代接種した。

細胞系の薬剤処理

融合細胞を、前記の組織培養について用いた2mlの培地中6ウェル試験プレート中に入れ、5μMおよび10μMのPPARδ特異性作用物質、化合物Fで処理した。DMSOを対照として用いた。化合物および培地を3日ごとに新しくし、細胞を1週間処理した。

【0079】

染色実験

ヘマトキシリン対比染色実験に関するOil Red O染色を、前記処理のそれぞれから得られた細胞に関して行った。培地を捨て、ウェルをPBS(2ml)で洗浄した。細胞を10%ホルマリン(1ml)中に1時間固定し、PBS中で2回洗浄した後、60%イソプロピルアルコールでさっとすすいだ。Oil Red O溶液(1ml)(Sigma)を添加し、3時間後に除去した。ウェルをその後PBSで2回洗浄した。対比染色のために、ヘマトキシリン比色染料(1:10、1ml)(Sigma)を添加し、PBSで2回洗浄することにより5分後に除去した。2回目の洗浄液はウェル中に放置した。

結果

1週間後、対照細胞は脂質蓄積を示さなかった。化合物Fで処理した細胞について、脂質蓄積が観察され、著しくマクロベシクル性であった。すなわち、脂質蓄積は核周辺だけでなく、星状細胞プロセスにおいても存在した(図14参照)。

【0080】

(実施例)

実施例1：アテローム性泡沫細胞の形成におけるPPARδの役割

活性化マクロファージは、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体の3形態すべて、すなわち、アルファ(α)、ガンマ(γ)、およびデルタ(δ)を発現する。実施例1に記載する研究において、本発明者らは、PPARδの発現がホルボールエステルによるマクロファージ活性化に必要であり、PPARδがマクロ

ファージ泡沫細胞形成を促進することを証明する。PPAR γ 作用物質はマクロファージ活性化を調節し、著しい抗炎症作用を有することがすでに示されている。この実施例において、本発明者らはPPAR δ 作用物質、ロシグリタゾンがマクロファージ泡沫細胞形成を阻害することを証明する。したがって、PPAR γ およびPPAR δ はマクロファージ脂質代謝および分化において対抗役割を媒介する。これらの結果から、意外にも、PPAR δ の拮抗作用リガンドは心血管疾患の予防用医薬として有力な候補であることが示される。実験物質および方法を図凡例に記載する。

【0081】

結果

泡沫細胞モデルの確認

単球細胞系はアテローム発生の分子の基礎の基礎研究において広く用いられている。本発明者らは、脂質および食用脂肪の影響、ならびにストレスおよび炎症の影響を調査した。この研究に関するほとんどの多目的細胞系はヒト細胞系THP-1である。この細胞系は、通常の条件下で懸濁液中で成長するが、炎症性刺激、例えば、ホルボールエステルは強力な分化や、細胞が付着し、より「マクロファージ様」になる炎症応答を誘発する。この細胞系は、遺伝子発現の変化により脂肪酸および酸化LDLに反応することも知られ、酸化LDLは細胞質脂質蓄積を促進することが示されている。これらの調節現象は、アテローム硬化性プラーク形成において起こる初期事象としてみられる(12)。

【0082】

本発明者らは、THP-1細胞のホルボールエステル刺激がPPAR δ mRNAのレベルが大きく増大させるという観察により、炎症プロセスとこれらの細胞の脂質病理間の重大な結びつきを見いだした。他のグループは、炎症性刺激がマウスおよびヒトマクロファージに、ならびに単球由来細胞系、例えば、THP-1およびU937においてPPAR γ の発現を増加調節することを証明した(13-15)。PPAR δ は、マウスから得られるチオグリコレート惹起性腹膜マクロファージにおいて発現されることが証明されている(13)。本発明者らはまた、活性化されたTHP-1細胞は、アテローム発生に関連する多くの炎症性

遺伝子産物、例えば、MCP（単球走化性蛋白）、IL-8、IL-1 β およびトロンボキサンシンターゼを発現し（図2）、活性化によりこれらの遺伝子産物のいくつかの発現は脂肪酸により調節されることを見いだした。アポリポプロテインEの発現は活性化により増大し、これは脂肪酸により著しく阻害されるという発見は重要である。これらの結果は、このシステムがヒト血管疾患の良好なモデルとされるのに適した方法で脂肪酸および炎症性刺激に応答することを示す。本発明はまた、接着性THP-1細胞を多不飽和脂肪酸、例えば、リノール酸で処理すると、細胞質中に脂肪滴が蓄積されることを見いだした（図3A）。これらの脂質含有マクロファージは泡沫細胞として知られている。PPAR/RXRヘテロ二量体が泡沫細胞形成の調節に関与することは、レチノイドX受容体（LG100268）の活性化リガンドが脂肪酸との共同作用において泡沫細胞形成を促進したことにより示唆される。リノール酸はPPARの非常に特異的なリガンドではないが、PPAR α および δ を効率的に活性化し、一方、PPAR γ の不良なアクチベーターである。これらの細胞をPPAR α アクチベーターWy14643で処理しても効果はなく、この形態の活性化マクロファージにおける発現が低いことと一致する（図1）。ロシグリタゾン、BRL49653も泡沫細胞を産生しなかった；これらの細胞はPPAR δ を含むことが知られている。実際、BRL49653処理の結果、未処理細胞と比較すると脂質沈積が減少し（図3A）、泡沫細胞のリノール酸およびレキシノイド促進を阻害することができる（データは示していない）。これらのデータはまとめて、PPAR δ は泡沫細胞の促進における脂肪酸の分子標的であり、PPAR γ は泡沫細胞機能の負のレギュレーターであることをはじめて示唆するものである。

【0083】

ロシグリタゾン（BRL49653）は泡沫細胞に抵抗する。

本発明者らのデータは、マクロファージ活性化および脂質蓄積の拮抗作用におけるPPAR γ の役割を支持する。本発明者らはまた、BRL49653での処理によるTHP-1細胞の細胞接着性は、未処理細胞について観察されるよりも遅い（データは示していない）。この阻害的役割は、Natureにおいて2つの論文により記載され、ここにおいて、PPAR γ による炎症メディエータの負の調節

が証明された(13, 14)。本発明者らは、BRL49653のIL-1 β 発現に対する影響を調べることにより、TZDの抗炎症作用を確認した。実際、BRL49653処置は、IL-1 β mRNAレベルの降下につながる(図4A)。アクチンと比較して、TNF α mRNAの減少も観察されたが、この減少はあまり劇的ではない(図4B)。スカベンジャー受容体CD36による脂質の取り込みは、THP-1細胞におけるPPAR γ により調節されることが示され(16, 17)、本発明者らは、CD36が活性化されたTHP-1細胞においてTZDにより調節されることを見いだしたが(図3C)、これらの細胞は泡沫細胞を形成しない(図2)。したがって、CD36増加調節は泡沫細胞形成を拮抗する。TZDはチアゾリジジオンクラスの薬剤であり、BRL49653を包含する。

【0084】

泡沫細胞モデルの遺伝子調節

PPAR δ が脂肪酸誘発泡沫細胞形成に関与するかどうかを確かめるために、細胞系を、PPAR δ を過剰発現するか、またはPPAR δ アンチセンスmRNAを発現するTHP-1細胞から発生させた。PPAR δ をコードするcDNAを、ヒトサイトメガロウイルスからの強力なエンハンサーの制御下で転写を行うベクター(pCLDN)中にクローンした(図5A)。このベクターはまた、標的細胞の選択のために、ネオマイシン耐性遺伝子も含む。cDNAを遺伝子中に、PPAR δ 蛋白発現のためのセンスDNAを発現するために(pCLDNPPAR δ -S)両方向に、またPPAR δ 発現を遮断するために(pCLDNPPAR δ -AS)アンチセンス方向に挿入した。THP-1細胞をpCLDNPPAR δ -SまたはpCLDNPPAR δ -ASでトランスフェクションし、1mg/ml G418を用いて、G418において健全な成長が観察されるまで選択した。細胞を次にG418選択から放出させ、ベクター単独の対照はG418の存在下でも分化しなかった。G418は蛋白キナーゼC活性の阻害物質であることが知られ、したがって、ホルボールエステル作用の拮抗物質である。G418選択から回収した後、6の独立してトランスフェクションしたポリクローナル細胞系におけるPPAR δ 過剰発現をRNAse保護(図5B)およびウェスタン

プロットイング (図 5 C) により確認した。これらの細胞系は正常に成長し、組織培養フラスコに付着しないが、PMAで処理した場合に、付着性になり、野生型細胞と比較して、添加された脂肪酸がない場合でさえも、多量の細胞内脂質を蓄積する (図 6)。BRL 49653 処理は、PPAR δ による泡沫細胞形成を防止することができる。脂肪酸分析により、細胞脂質における増加は主にトリグリセリドにおけるものであり、このブールはBRL 49653の作用により排出されることがわかる (図 6 B)。トリチウム標識オレイン酸を用いて、本発明者らは、親およびPPAR δ 過剰発現細胞系における脂肪の取り込みおよび流出を分析した。本発明者らは、取り込みおよび流出は、非活性化状態における2つの細胞系間で本質的に同じであることを見いだした (図 7 AおよびB)。しかしながら、活性化細胞において、流出はPPAR δ 過剰発現細胞系から著しく低いことは明らかである (図 7 C)。

【0085】

PPAR過剰発現細胞は、親細胞系と比較して劇的に減少 (35倍) したApoe mRNAレベルを有する (図 8)。apoEはリノール酸での処理後に親細胞において観察されるのと同じレベルまで減少することは重要である。このデータから、PPAR δ がApoe遺伝子発現の脂肪酸阻害を媒介することが明らかになる。PPAR δ アンチセンスRNA (PPAR δ AS) を発現する細胞も正常に成長したが、PMAで処理した場合、これらの細胞は分化しなかった (図 9 A)。どのPMAの濃度 (0.1 ng - 25 ng/ml) でも分化は観察されなかった。PMAで一夜処理したPPAR δ AS細胞のトリパンブルー染色により、細胞は処理により死んだことが明らかになった (図 9 B)。DAPI (4N、6-ジアミノ-2-フェニルインドール、Molecular Probes, Oregon) 染色により判断されるようなDNA濃縮の証拠はなかった (データは示していない)。DNAのフラグメント化はこれらの死細胞から調製されたゲノムDNAのアガロースゲル電気泳動においてみられなかった (データは示していない)。したがって、PMA処理されたPPAR δ アンチセンス細胞はアポトーシスにより死なないようである。PKCおよびホスホリパーゼAの阻害物質を用いて、本発明者らは親THP-1細胞の分化を遮断することができることを証明した (図 10 A)；

しかしながら、PPAR δ -アンチセンス細胞はホルボールエステルおよびこれらの阻害物質の存在下で死ぬようである（図10B）。これにより、死の原因は、分化プロセスにおけるPKC活性化の下流でないことが示唆される。

【0086】

本発明者らは、マクロファージの炎症活性化にPPAR δ が必要であること（THP-1細胞の活性化により証明される）、およびPPAR δ が泡沫細胞形成を促進することを証明した。PPAR δ の過剰発現は、これらの細胞における脂肪貯蔵を著しく修飾し、これは、一部はアポプロテインEをコードする遺伝子の発現の修飾により達成される。PPAR δ 活性の阻害（拮抗作用）は泡沫細胞形成を防止し、PPAR δ 活性の阻害物質である薬剤の開発は、アテローム発生の結果として起こる多くの障害の予防および/または治療において有用である。

【0087】

実施例2：脂質蓄積はPPAR δ の作用物質により促進される。

PPAR δ 選択性作用物質（WO97/28149の9ページの化合物F）は実施例1に記載したTHP-1分析において脂質蓄積を促進し、泡沫細胞形成を促進する。WO97/28149は心血管疾患を治療するためにPPAR δ 作用物質（ならびに他の開示された化合物）を用いることを提案しているが、本発明者らは、この化合物が泡沫細胞形成を促進することを証明した。この効果は、500nM未満で明らかであり、5~10 μ Mの間で最大である（図11A参照）。化合物Fは、泡沫細胞形成の促進においてRXRリガンドLG100268と共同する（図11B）。この薬理活性は、実施例1において記載されている研究から本発明者らが予測したものである。化合物FはさらにTHP-1細胞（図12）および一次ヒト単球（図13）の両方においてマクロファージ泡沫細胞形成を促進する。

【0088】

実施例3：PPAR δ 活性の阻害物質のスクリーニング

結合検定：

放射リガンドろ過検定

組み換え体hPPAR δ を、WO97/28149およびBergerら、(1999)J

. Biol. Chem. 274, 6718-6725に記載されているように、試験化合物の存在下で放射性リガンド [^3H] $_2\text{L-783483}$ と混合する。 L-783483 は $K_d=1\text{ nM}$ である。混合物を混合セルロースフィルターにかけ、フィルターから真空により液体を吸引する。フィルター上に残存する放射能はPPAR δ と結合した L-783483 を表す。放射能結合における減少は、競合するPPAR δ 化合物の存在を示す。この分析は、試験化合物の結合特性を定量する。

【0089】

蛍光脂肪酸置換

シスまたはトランスバリナリン酸の結合は、PPARリガンドの蛍光分析を提供する。「シスバリナリン酸」は、9, 15-シス、11, 13トランスバリナリン酸である。「トランスバリナリン酸」は、9, 11, 13, 15トランスバリナリン酸である。いずれもMolecular Probes, Oregonから入手可能である。組み換えPPAR δ をこれらの脂肪酸と混合し、試験化合物は、有意な試験化合物の結合が起こるならば脂肪酸/PPAR単独の存在下で観察されるよりも生じる蛍光が少ない。この分析は、試験化合物がPPAR δ と結合するかどうかを定量する。

この分析は、適当な蛍光光度計を用いてマルチウェル様式において行うことにより容易に自動化され、高処理量が得られる。

【0090】

コアクチベーター/受容体/リガンド相互作用分析 (CARLA)

コアクチベーター蛋白、例えば、RIP140またはSRC-1のPPAR δ に対する結合はリガンドの存在に依存する。RIP140およびSRC-1はPPAR δ と結合する蛋白である (Kreyら, (1997) Mol. Endocrinol. 11, 779-791)。コアクチベーターはインビトロで、 ^{35}S 標識されたメチオニンの存在下で翻訳され、精製された組み換えhPPAR δ と試験化合物の存在下で混合される。hPPARを免疫沈降させ、沈殿をSDS/PAGE、続いてオートラジオグラフィーにより分析し、コレセプターに対応する放射活性シグナルの存在は、PPAR δ リガンドの存在を示す。この分析は、拮抗物質であることを示すコアクチベーター結合を同定するために用いることができる；これは、各分析にお

いて存在する公知の作用物質により達成される（前記参照）。

【0091】

機能分析

一過性トランスフェクションレポーター構築分析

Cos-1またはCV-1細胞をPPAR δ の発現構築物およびレポーター構築物とルシフェラーゼでPPAR依存性エンハンサーの制御下でトランスフェクションする。PPAR δ -依存性エンハンサーは、アシル-CoAオキシダーゼおよびシトクロムp4504A6遺伝子由来のものを包含する。これは、さまざまなマルチウェル培養様式において行うことができ、トランスフェクションされた細胞をPPAR δ の公知の作用物質および試験化合物で処理する。細胞をその場で溶解させ、ルミノメーターでルシフェラーゼ活性について分析する。高処理量スクリーニングに適するルミノメーターが利用できる。前記分析は、試験化合物がPPAR δ 作用物質の活性を遮断する能力を調べる。

【0092】

安定な細胞系レポーター構築物分析

抗生物質耐性マーカーをコードする以外は前記と同様の構築物で細胞系をトランスフェクションする。これにより、安定にPPAR δ を発現し、ゲノム中に組み入れられるレポーター配列を含む細胞系を選択できる。この細胞系を成長させ、繰り返し費用がかかるトランスフェクションをする必要なしにPPAR δ 活性化化合物の検出に用いる。

【0093】

実施例4：泡沫細胞分析

泡沫細胞分析を用いて、潜在的な抗アテローム発生性化合物を同定する。マクロファージ分化を誘発するために96-ウェルプレート培養においてTHP-1細胞を0.1~10ng/mlのPMAで処理する。THP-1細胞は、ECC受入番号88081201として入手可能である。

脂肪酸の供給源は、血清（Sigmaから入手されるCPSR-3血清代替物）または20~100 μ Mリノール酸のいずれかである。

分化するマクロファージ細胞における脂肪酸の蓄積を試験化合物の存在下また

は不在で、3～7日後、Nile Red染料を用いて測定する。

試験化合物がない場合と比較して脂肪の蓄積を減少させる試験化合物を有効な抗アテローム発生剤またはリード化合物として選択する。

【0094】

実施例5：前立腺癌細胞試験

本発明者らは、PPAR δ 作用物質、化合物Fが前立腺上皮成長を刺激できることを見いだした。最少に形質転換された細胞PNT1Aおよび非形質転換前立腺ガン細胞(LNCaP)はいずれも低濃度の化合物Fにより40%まで成長が刺激された。この効果は、RXRリガンドLG100268についても見られる。また、低濃度の化合物FおよびLG100268はいずれも細胞の成長を著しく増大させないが、培地において一緒に添加されると細胞の成長を刺激する。高度に形質転換された前立腺ガン細胞系PC3はこれらの細胞系の中で最も早く成長し、化合物Fにより刺激されない。

【0095】

本発明者らは、PC3細胞をPPAR δ アンチセンスRNAの発現構築物でトランスフェクションした；これらはすべて成長しなかった。対照的に、PPAR γ アンチセンスRNAを発現する細胞系が生じ、これは変化しているが、確認できる成長をした。すべての実験において、空発現ベクターを含む細胞系が生じ、表現型を有さない。これらの実験は、PPAR δ が前増殖的であり、PPAR δ 拮抗物質が癌の治療において有用であることを支持する。

細胞系を、2500細胞/ウェルで24ウェルプレートにプレートし、5%デキストランでコートされた活性炭処理FCSを含むRPMI中で培養した。培地中化合物FまたはLG100268の濃度を増大させ、培養物を7日間、薬剤および培地を48時間ごとに変えながら維持した。各ウェル中の最終細胞数を比色分析により定量し(Landegreen U. J. Immunol. Meth. 67, 379-388, (1985))、相対的成長を対照ウェルにおける細胞数の百分率で表した。

【0096】

引例

1. Issemann, I. & Green, S. (1990) "Activation of a member of the steroid

hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators" *Nature* 347, 645-50.

2. Dreyer, C. R. (1992) "Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors" *Cell* 68, 879-87.
3. Palmer, C. N. A. R. (1998) "Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver" *Molecular Pharmacology* 53, 14-22.
4. Lee, S. S.-T. R. (1995) "Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators" *Mol. Cell. Biol.* 15, 3012-3022.
5. Forman, B. M. R. (1995) "15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma" *Cell* 83, 803-812.

【0097】

6. Lehmann, J. M. R. (1995) "An anti-diabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for Peroxisome proliferator activated receptor gamma" *J. Biol. Chem.* 270, 12953-12956.
7. Barak, Y. R. (1998) "PPAR-gamma-null mice Early embryonic lethality due to a putative placental defect" Abstract No 303. Keystone Symposium on The Nuclear Receptor Gene Family. Incline Village, Nevada.
8. Schmidt, A. R. (1992) "Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids" *Molecular Endocrinology* 6, 1634-1641.
9. Saxena, U. R. (1992) "Lipoprotein lipase-mediated lipolysis of very low density lipoproteins increases monocyte adhesion to aortic endothelial cells" *Biochemical & Biophysical Research Communications* 189, 1653-1658.
10. Frostegard, J. R. (1990) "Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line THP-1" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 155-163.

ne U937" Proc. Natl. Acad. Sci USA 87, 904-908.

【0098】

11. Tekeltaub, R. ら、(1994) "Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity" Arterioscler. Thromb. 14, 47-53.
12. Ross, R. (1993) "The pathogenesis of atherosclerosis; A perspective for the 1990s" Nature 362, 801.
13. Ricote, M. ら、(1998) "The peroxisome proliferator activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation" Nature 391, 79-82.
14. Jiang, C. ら、(1998) "PPAR γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines" Nature 391, 82-86.
15. Marx, N. ら、(1998) "Macrophages in human atheroma contain PPAR γ " Am. J. Pathol. 153, 17-23.
16. Tontonoz, P. ら、(1998) "PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL" Cell 93, 241-252.
17. Nagy, L. ら、(1998) "Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ " Cell 93, 229-240.

【図面の簡単な説明】

- 【図1】 THP-1細胞におけるPPARの発現を示す。
- 【図2】 THP-1細胞におけるアテローム発生性遺伝子発現を示す。
- 【図3】 ロシグリタゾンにより阻害される泡沫細胞の形成を促進する脂肪酸およびレキシノイドを示す。
- 【図4】 ロシグリタゾンはTHP-1細胞における遺伝子発現を調節することを示す。
- 【図5】 PPAR δ を構成的に発現する細胞系の発生を示す。
- 【図6】 PPARデルタ過剰発現は泡沫細胞形成を促進することを示す。
- 【図7】 脂肪酸流出が、活性化PPARデルタ過剰発現細胞において阻害されることを示す。

【図8】 ApoE遺伝子発現はPPAR δ を介して脂肪酸により調節されることを示す。

【図9】 PPAR δ の阻害が泡沫細胞形成を防止することを示す。

【図10】 PPAR δ の死の防御はPKCの下流でないことを示す。

【図11】 脂質の蓄積がPPAR δ の作用物質、化合物Fにより促進されることを示す。

【図12】 化合物F、PPAR δ 作用物質が、THP-1グリア細胞からのマクロファージ泡沫細胞形成を促進することを示す。

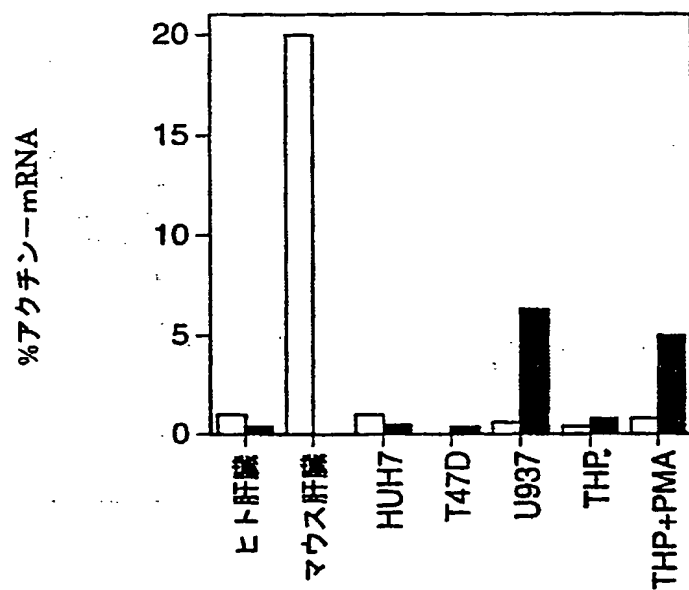
【図13】 化合物Fが一次ヒト単球からのマクロファージ泡沫細胞形成を促進することを示す。

【図14】 PPAR δ により促進されるグリア細胞における脂質の蓄積を示す。

【図15】 化合物Fが前立腺癌細胞系の分化を刺激することを示す。

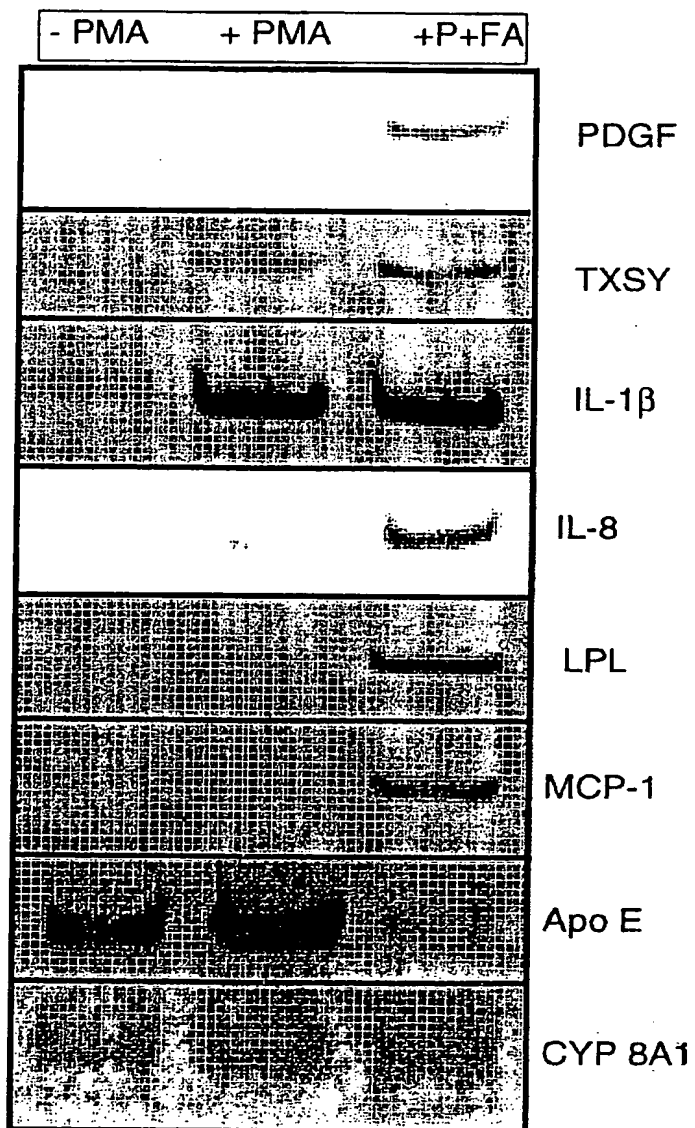
【図1】

FIGURE 1



【图2】

FIGURE 2



【図3A】

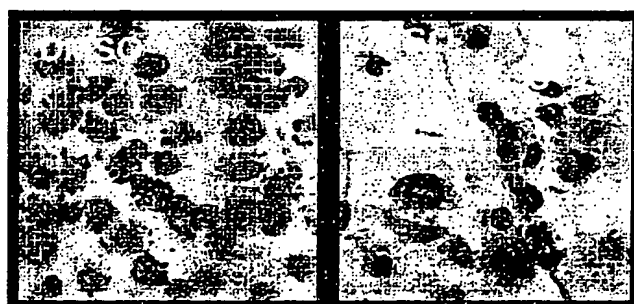
FIGURE 3.

A



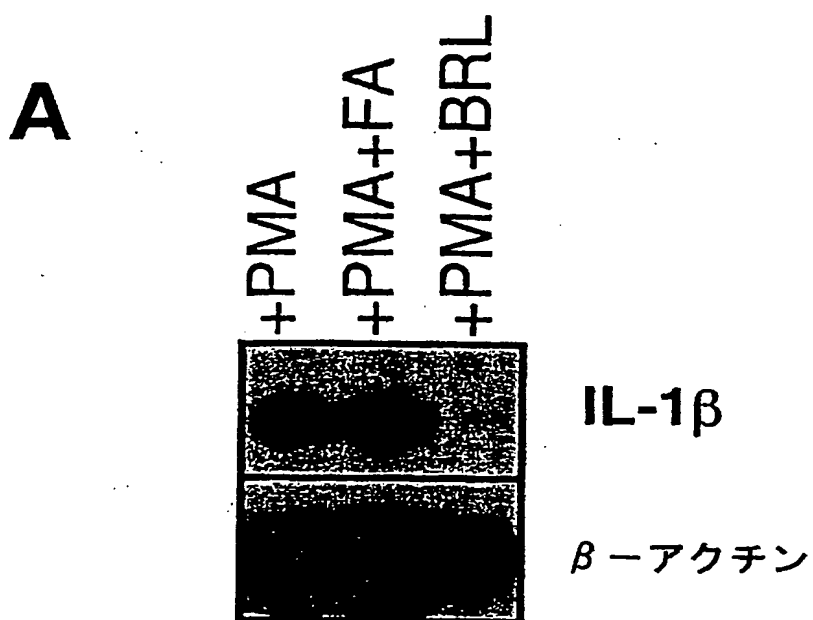
【図3B】

B



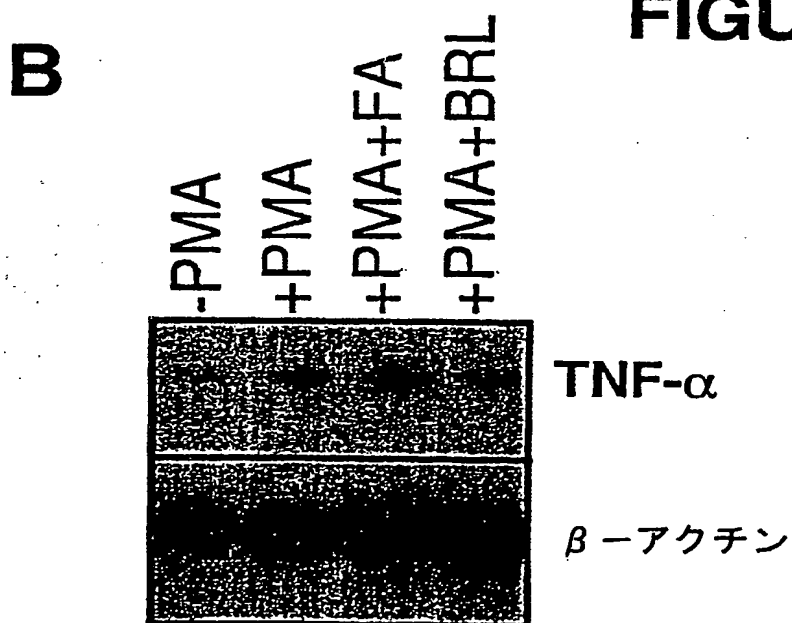
【図 4 A】

FIGURE 4



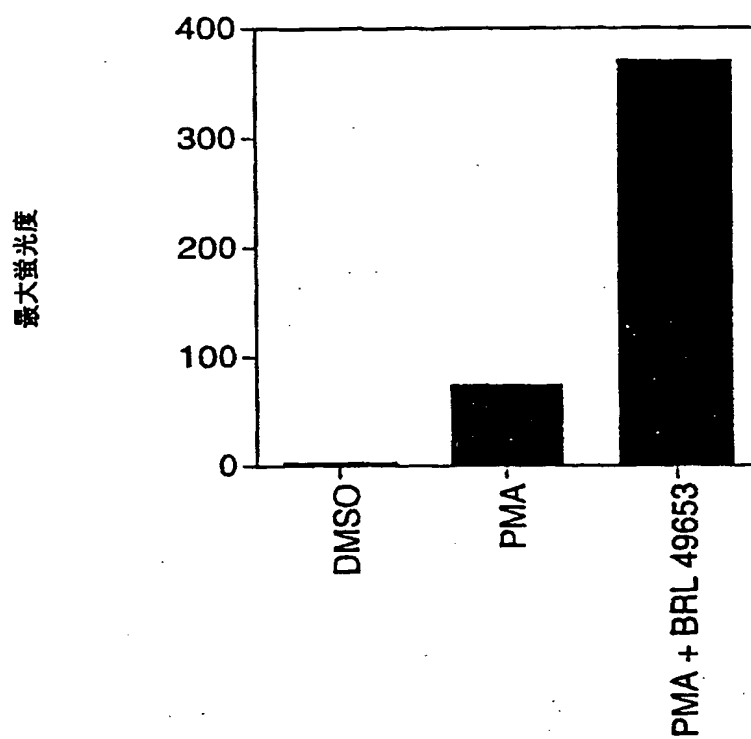
【図 4 B】

FIGURE 4



【図4C】

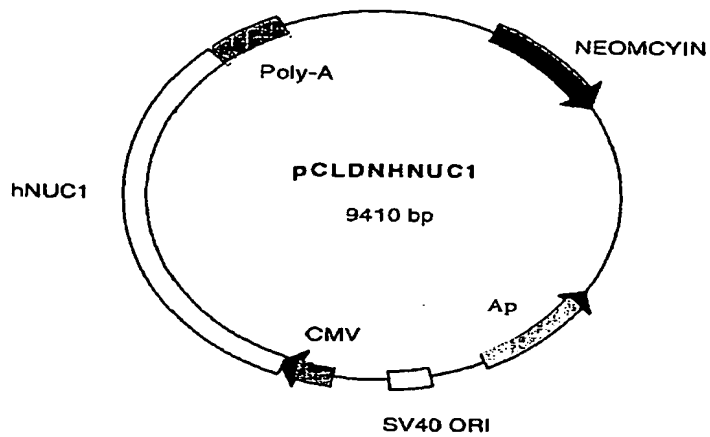
FIGURE 4C



【図 5 A】

A

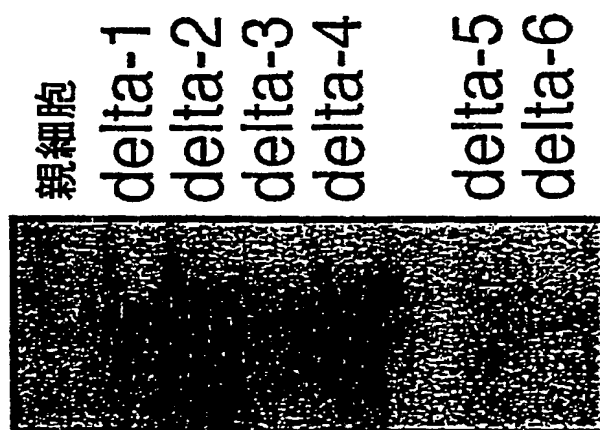
FIGURE 5



【図 5 B】

B

FIGURE 5



【図 5 C】

C FIGURE 5



FIGURE 6A

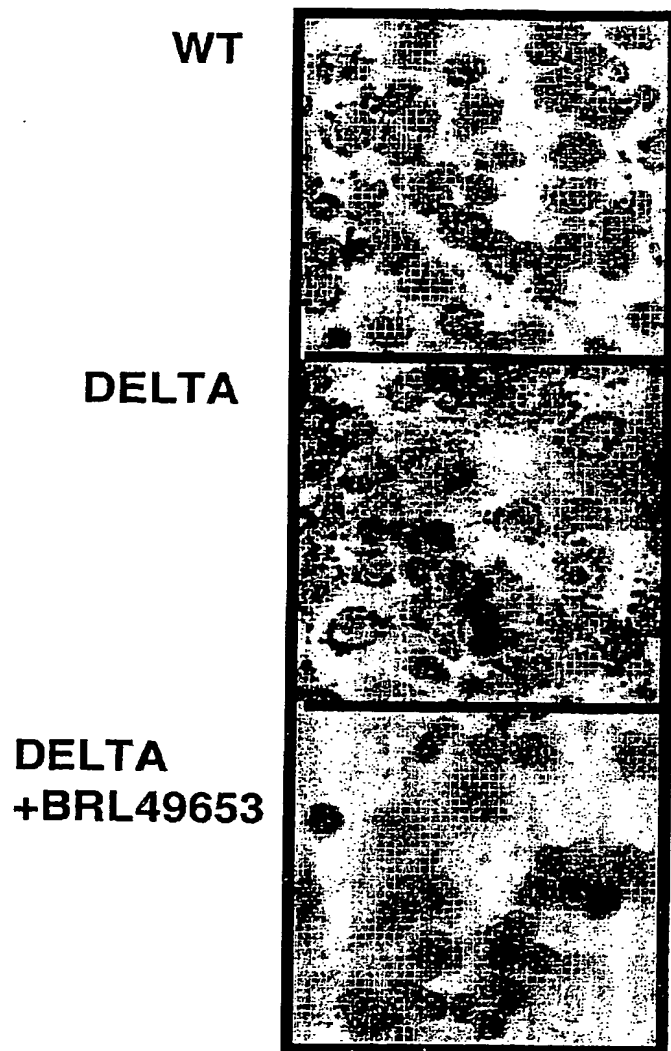
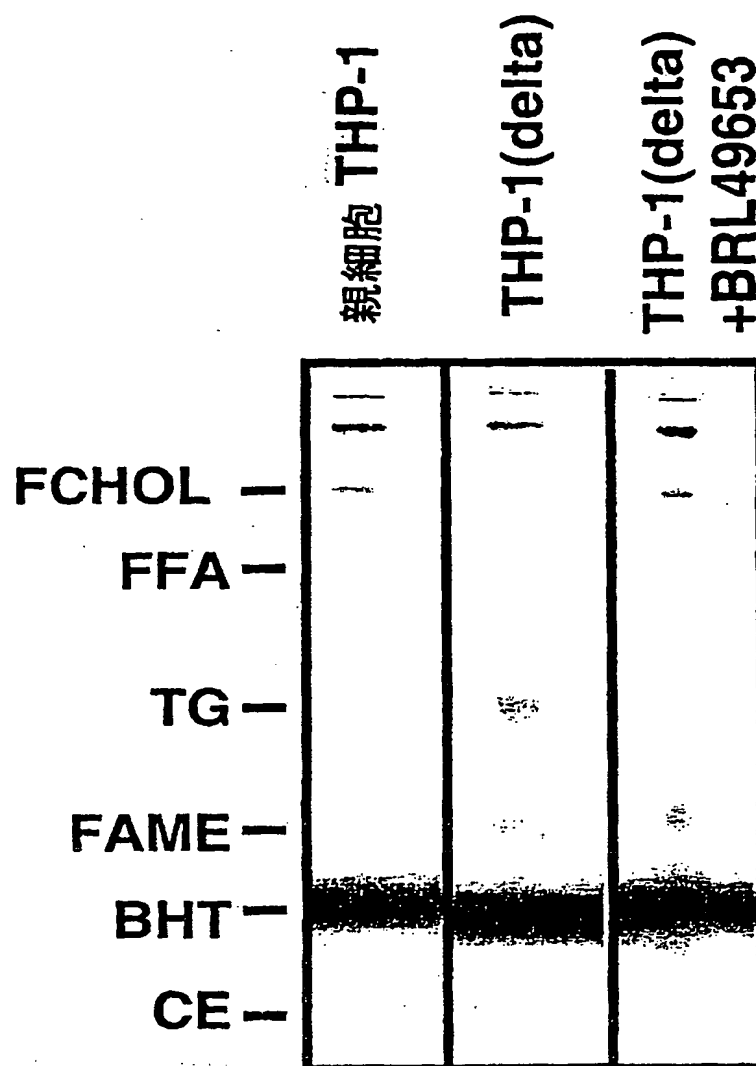


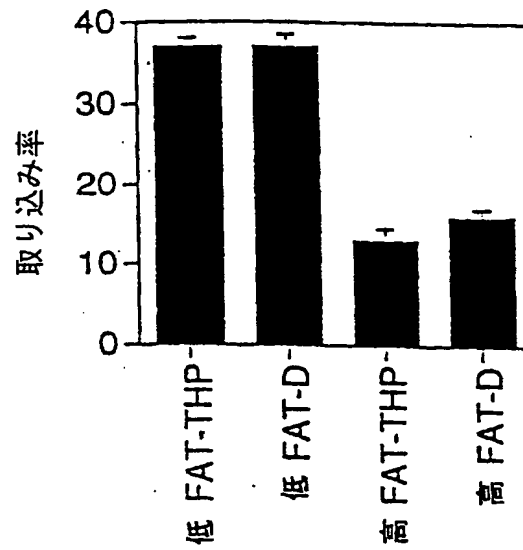
FIGURE 6B



【図 7 A】

A

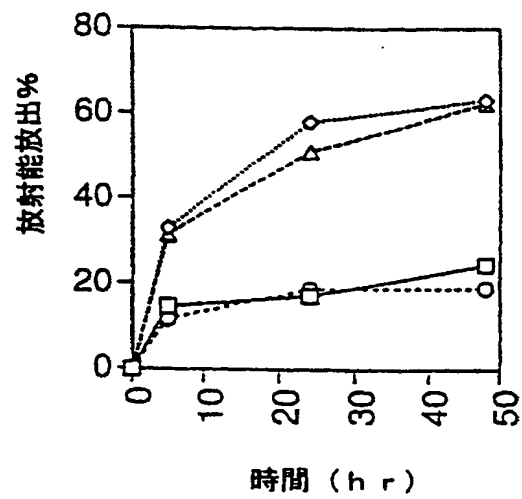
Figure 7



【図 7 B】

B

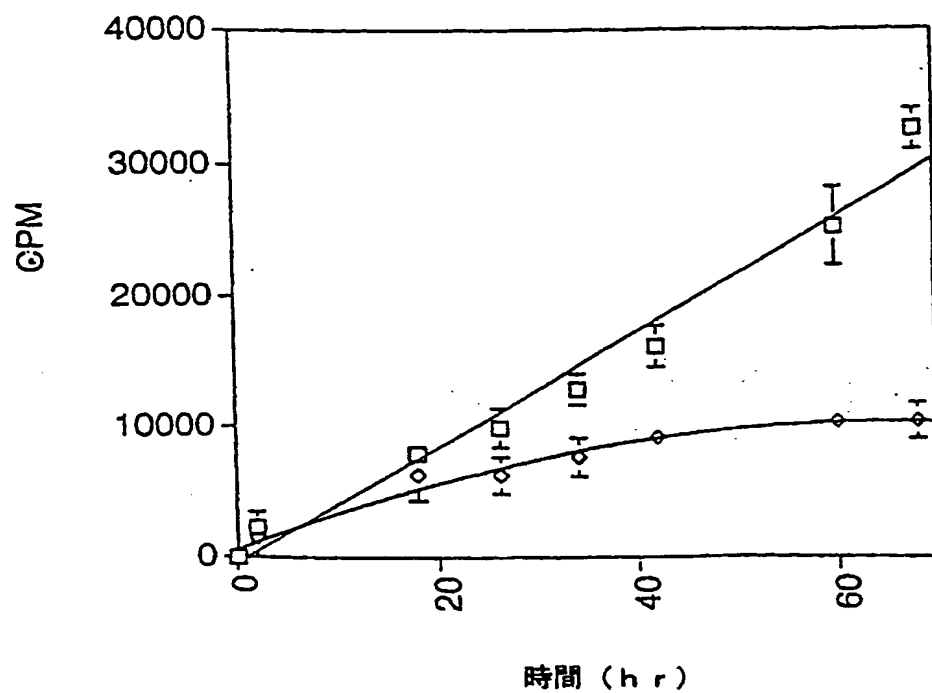
Figure 7



【図7C】

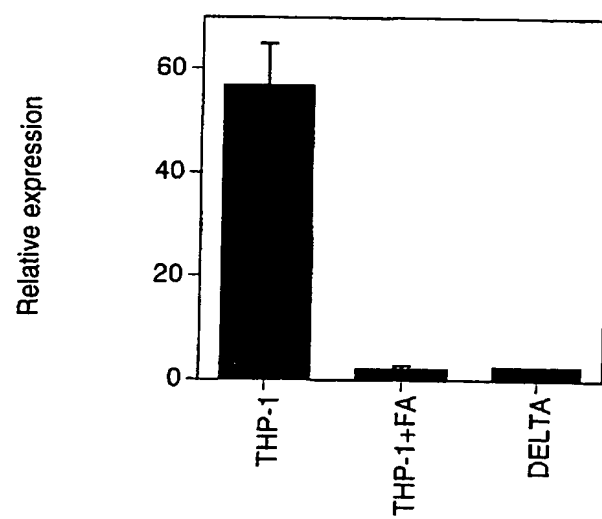
C

Figure 7



【图8】

FIGURE 8

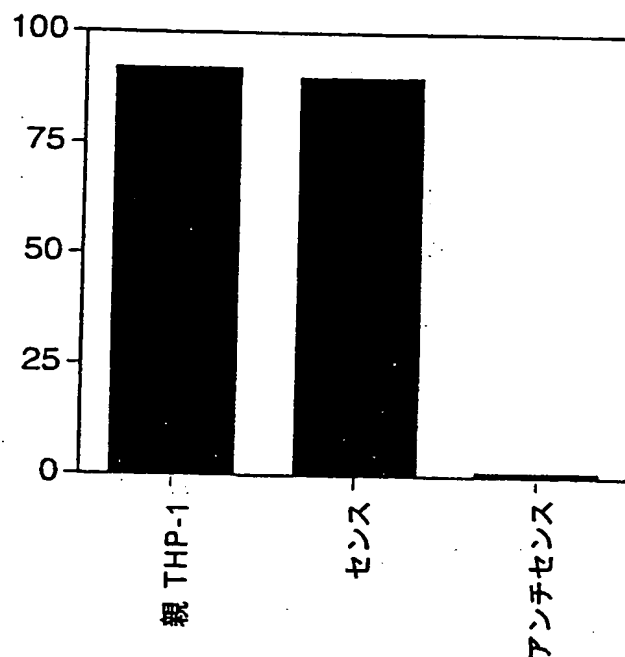


【図9A】

FIGURE 9

A

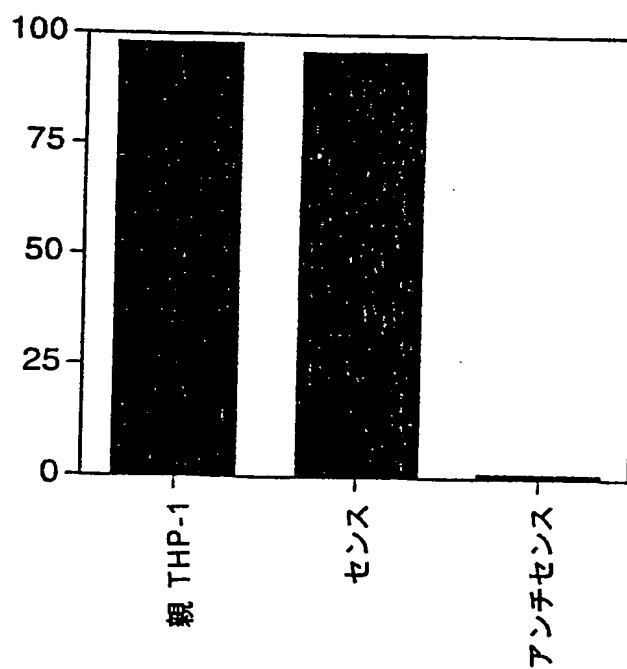
分化 %



【図9B】

B

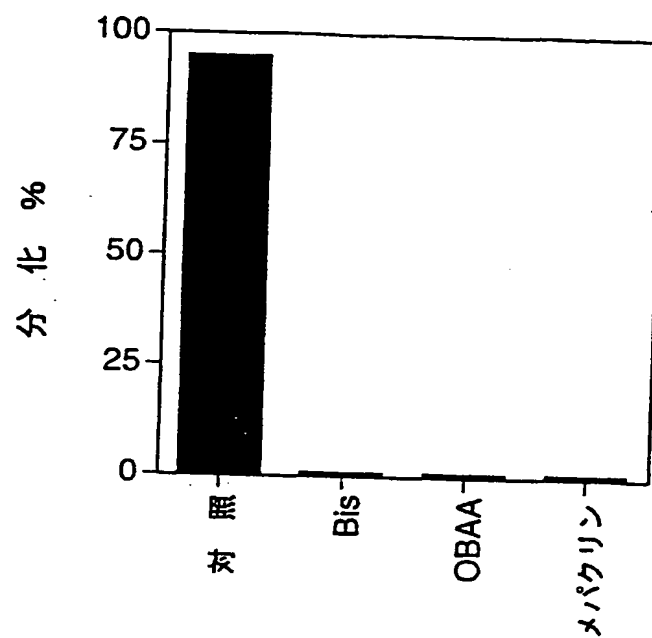
生存 %



【図10A】

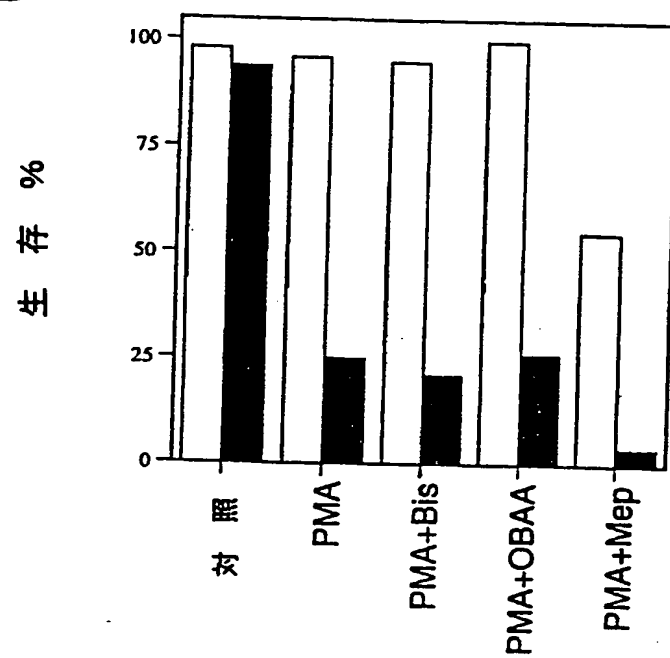
A

Figure 10



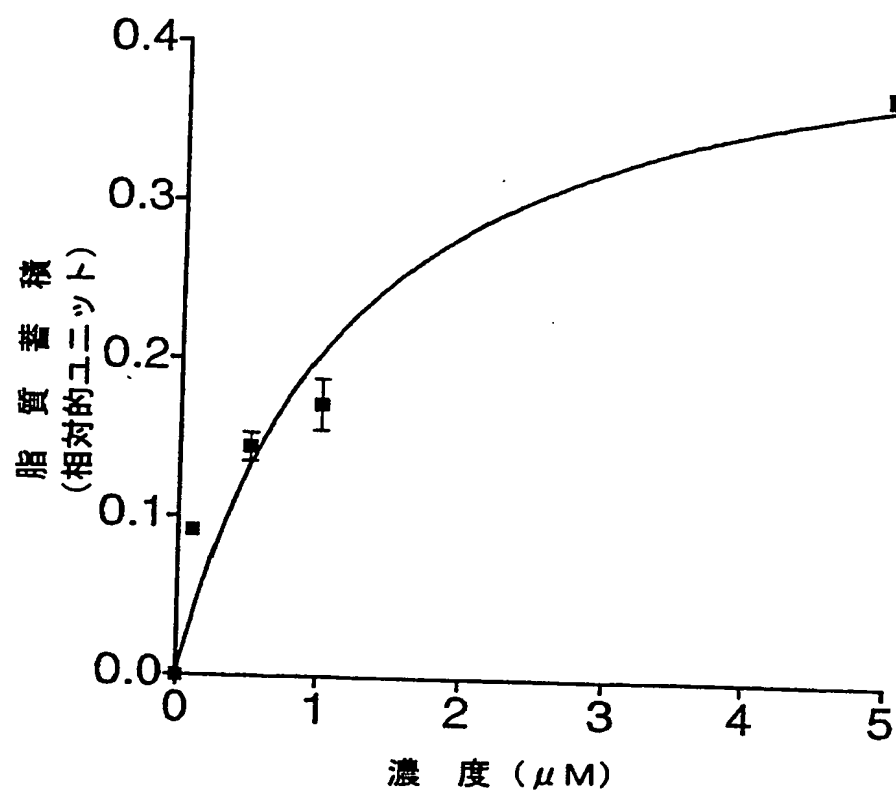
【図10B】

B



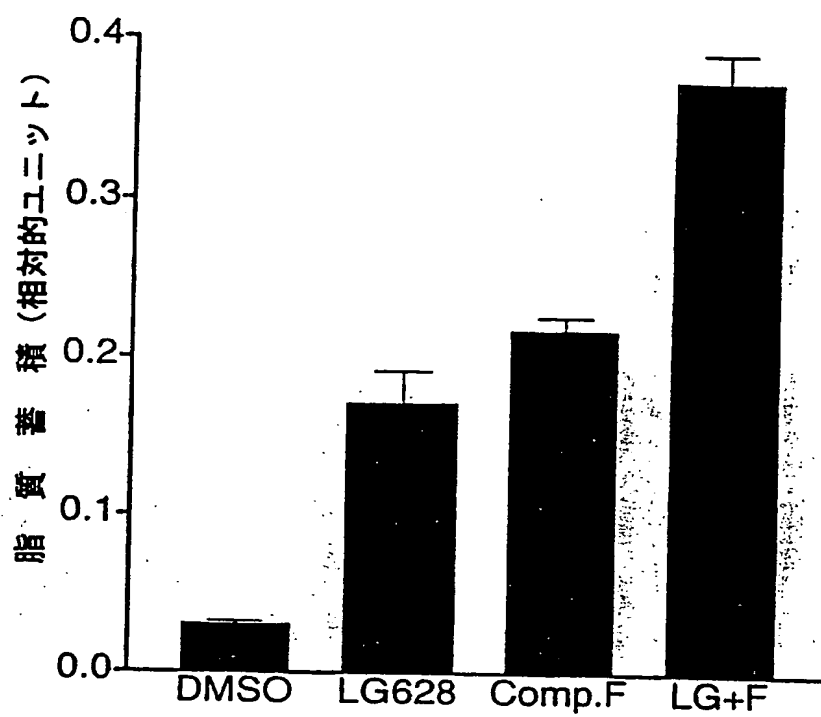
【図 11 a】

Figure 11a



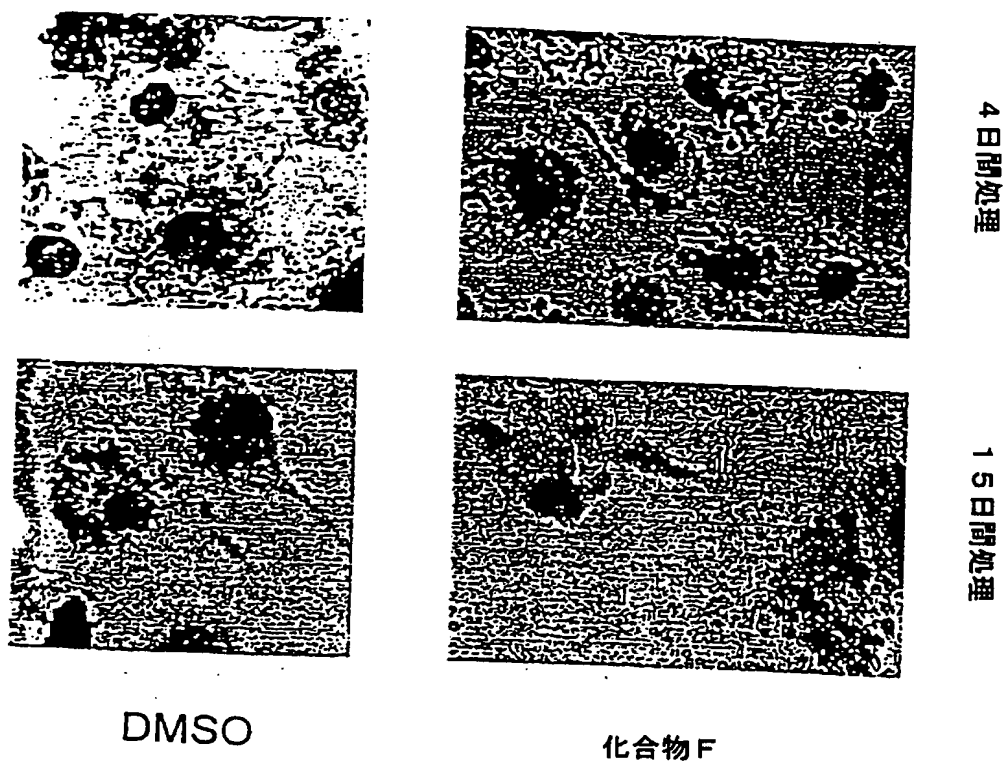
【図11b】

Figure 11b



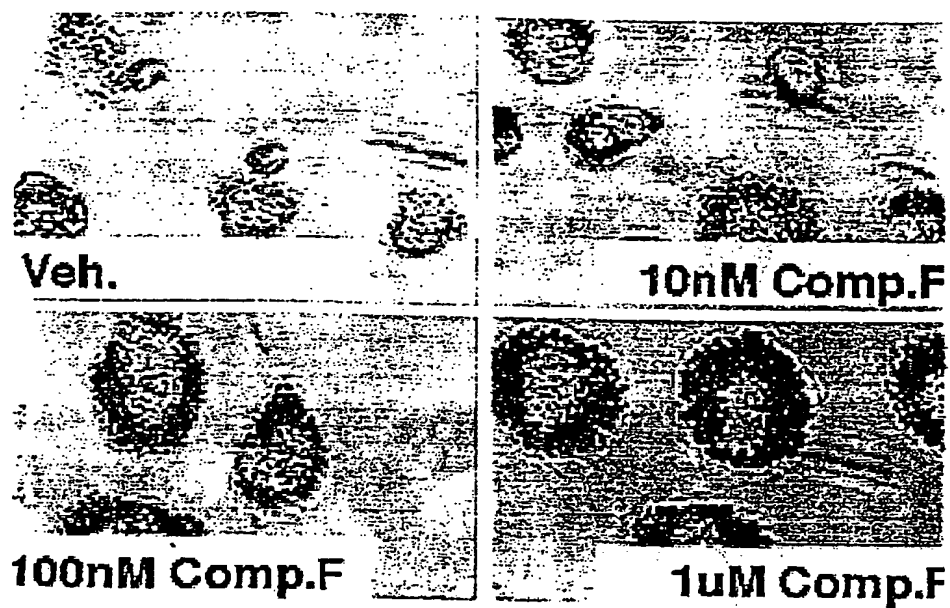
【図12】

Figure 12



【図 13】

Figure 13



【図14】

Figure 14

対 照



化 合 物 F

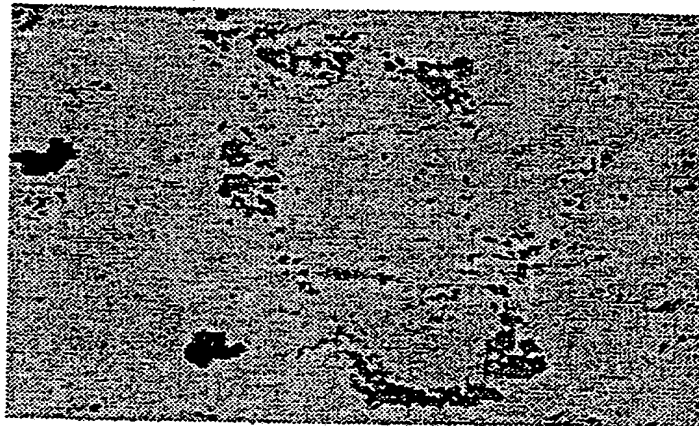
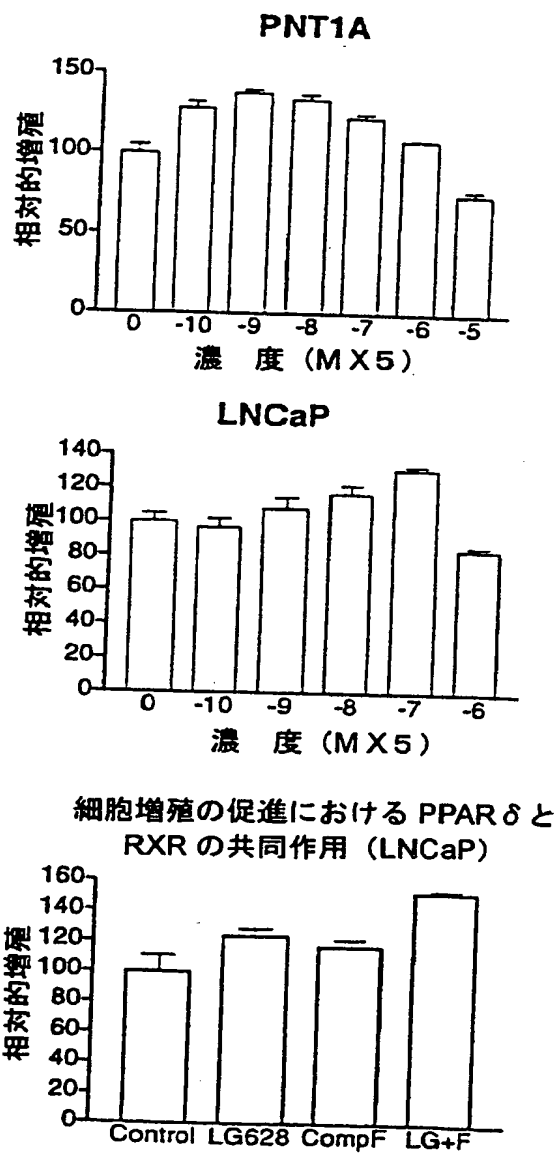


Figure 15
化合物Fによる前立腺癌
細胞の増殖の刺激



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/EP 00/06986		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K38/17 A61K31/00 A61K48/00 G01N33/50 A61P9/10 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00		
According to international Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, LIFESCIENCES, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	WILLSON T M ET AL: "The PPARs: From orphan receptors to drug discovery." JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 43, no. 4, 24 February 2000 (2000-02-24), pages 527-550, XP002158740	
P,A	PETERS J M ET AL: "Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta (delta)." MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 20, no. 14, July 2000 (2000-07), pages 5119-5128, XP002158741 cited in the application	
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Δ" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 January 2001		Date of making of the international search report 19/02/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5918 Patentean 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo st, Fac. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Teyssier, B

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 00/06986

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BERGER J ET AL: "Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 10, 5 March 1999 (1999-03-05), pages 6718-6725, XP002158742 cited in the application	21,25-27
X	the whole document	
A	RICOTE M ET AL: "Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 95, no. 13, 23 June 1998 (1998-06-23), pages 7614-7619, XP002158743	
A	POLLMAN M J ET AL: "Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease." NATURE MEDICINE, vol. 4, no. 2, February 1998 (1998-02), pages 222-227, XP002158744 cited in the application	
A	WO 97 28149 A (AUWERX JOHAN ; BERGER JOEL P (US); MERCK & CO INC (US); MOLLER DAVI) 7 August 1997 (1997-08-07) cited in the application	
P,X	MANO H ET AL: "Cloning and function of rabbit peroxisome proliferator-activated receptor delta/beta in mature osteoclasts." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 11, 17 March 2000 (2000-03-17), pages 8126-8132, XP002158745 the whole document	15,16, 36-38
X	WO 98 43081 A (LEFEBVRE ANNE MARIE ; AUWERX JOHAN (FR); PASTEUR INSTITUT (FR); BRI) 1 October 1998 (1998-10-01) page 9, line 8 - line 15 page 15, line 24 - line 32 the whole document	15,16, 21, 25-27, 36-38,45
A		
	-/--	

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1993)

page 2 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Pat. International Application No.
PCT/EP 00/06986

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHOU G ET AL: "Nuclear receptors have distinct affinities for coactivators: Characterisation by fluorescence resonance energy transfer" MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, vol. 12, no. 10, October 1998 (1998-10), pages 1594-1604, XP002915572 the whole document	21,25-27
X	KREY G ET AL: "Fatty acids, eicosanoids and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependant receptor ligand assay" MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, vol. 11, no. 6, June 1997 (1997-06), pages 779-791, XP002915086 the whole document	21,25-27
P,A	WO 00 32190 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE) 8 June 2000 (2000-06-08) the whole document	9,20

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Although claims 1-14, 39-40, 43 and 45 are directed, in part or in totality, to methods of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.

Claims 1-20, 36-42 and 45 relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely inhibition of PPAR delta activity, or to compositions, uses or methods of treatment involving said compound. The claims cover all compounds, or compositions or uses of all such compounds, having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts where the PPAR delta inhibitor is a PPAR delta antisense oligonucleotide, as in example 1, or a ribozyme (page 8, lines 29-31).

A generic search for the concept of PPAR delta antagonists or inhibitors was additionally performed.

In view of their wording, which render it difficult, if not impossible, to determine the matter for which protection is sought, present claims 43 and 44 fail to comply with the clarity requirements of Article 6 PCT to such an extent that a meaningful search is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which do appear to be clear, namely the methods of claims 1-14, 39-40 and 45 (further restricted to antisenses and ribozymes as explained above) and the methods of claims 21-35, respectively.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 00/06986

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9728149 A	07-08-1997	AU 1856997 A	22-08-1997
		AU 721452 B	06-07-2000
		AU 2115997 A	22-08-1997
		CA 2245529 A	07-08-1997
		EP 0888278 A	07-01-1999
		WO 9728115 A	07-08-1997
		AU 712607 B	11-11-1999
		AU 1858197 A	22-08-1997
		CA 2244831 A	07-08-1997
		EP 1011651 A	28-06-2000
		JP 2000504021 T	04-04-2000
		WO 9727847 A	07-08-1997
		AU 719146 B	04-05-2000
		AU 2250797 A	22-08-1997
		CA 2245524 A	07-08-1997
		EP 0904079 A	31-03-1999
		WO 9727857 A	07-08-1997
		AU 708055 B	29-07-1999
		AU 1856397 A	22-08-1997
		EP 0882029 A	09-12-1998
		WO 9728137 A	07-08-1997
		US 5859051 A	12-01-1999
		US 6090836 A	18-07-2000
		ZA 9700824 A	30-10-1998
		US 6020382 A	01-02-2000
		US 5847008 A	08-12-1998
		AU 719663 B	11-05-2000
		AU 5615298 A	17-07-1998
		EP 0948327 A	13-10-1999
		WO 9827974 A	02-07-1998
		US 6160000 A	12-12-2000
WO 9843081 A	01-10-1998	AU 6773598 A	20-10-1998
WO 0032190 A	08-06-2000	AU 2031200 A	19-06-2000

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 9/10	1 0 1	A 6 1 P 25/28	
25/28		35/00	
35/00		43/00	1 1 1
43/00	1 1 1	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02		G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15		33/50	Z
33/50		C 1 2 R 1:91	
/(C 1 2 Q 1/02		C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 R 1:91)			

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, B J, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, C A, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, K E, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, R U, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 コリン・ニール・アレキサンダー・パーマ

イギリス、ディディ1・9エスワイ、テイ
サイド、ダンディー、ナインウェルズ・ホ
スピタル・アンド・メディカル・スクー
ル、バイオメディカル・リサーチ・センタ
ー、ザ・ユニバーシティ・オブ・ダンディ
ー

(72) 発明者 ヘレン・ボスパー

イギリス、ディディ1・9エスワイ、テイ
サイド、ダンディー、ナインウェルズ・ホ
スピタル・アンド・メディカル・スクー
ル、バイオメディカル・リサーチ・センタ
ー、ザ・ユニバーシティ・オブ・ダンディ
ー

(72)発明者 チャールズ・ローランド・ウルフ
イギリス、ディディ1・9エスワイ、テイ
サイド、ダンディー、ナインウェルズ・ホ
スピタル・アンド・メディカル・スクー
ル、バイオメディカル・リサーチ・センタ
ー、ザ・ユニバーシティ・オブ・ダンディ
ー

Fターム(参考) 2G045 AA40
4B024 AA11 BA63 BA80 CA04 DA02
EA04 GA11
4B063 QA01 QA18 QQ20 QR47 QR69
QR77 QR80 QS24 QS28 QX02
4C084 AA13 AA17 BA25 DC50 MA52
MA55 NA14 ZA161 ZA361
ZA451 ZB261 ZC781
4C086 AA01 AA02 EA16 MA52 MA55
MA66 NA14 ZA16 ZA36 ZA45
ZB26 ZC78

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 February 2001 (01.02.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/07066 A2

(51) International Patent Classification⁷: A61K 38/00

Research Centre, Ninewells Hospital and Medical School,
Dundee, Tayside DD1 9SY (GB).

(21) International Application Number: PCT/EP00/06986

(74) Agent: RUTTER, Keith; SmithKline Beecham, Two New
Horizons Court, Brentford, Middlesex TW8 9EP (GB).

(22) International Filing Date: 19 July 2000 (19.07.2000)

(25) Filing Language: English

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
9917405.4 23 July 1999 (23.07.1999) GB

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (*for all designated States except US*): THE
UNIVERSITY OF DUNDEE [GB/GB]; 11 Perth Road,
Dundee, Tayside DD1 4HN (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): PALMER, Colin,
Neil, Alexander [GB/GB]; The University of Dundee,
Biomedical Research Centre, Ninewells Hospital and Med-
ical School, Dundee, Tayside DD1 9SY (GB). VOSPER,
Helen [GB/GB]; The University of Dundee, Biomedical
Research Centre, Ninewells Hospital and Medical School,
Dundee, Tayside DD1 9SY (GB). WOLF, Charles,
Roland [GB/GB]; The University of Dundee, Biomedical

Published:

— Without international search report and to be republished
upon receipt of that report.

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS OF TREATMENT AND DRUG SCREENING METHODS

(57) Abstract: A method of preventing or reducing foam cell development from macrophages, or removing foam cells, in a patient, the method comprising administering to the patient an effective amount of an inhibitor of PPAR δ activity. A method of preventing or treating a vascular disease associated with plaque formation and/or thrombotic blockage of the blood vessels in a patient, the method comprising administering to the patient an effective amount of an inhibitor of PPAR δ activity.



WO 01/07066 A2

METHODS OF TREATMENT AND DRUG SCREENING METHODS

The present invention relates to methods of treatment and drug screening methods; in particular, it relates to a target for cardiovascular drug design and compounds which are directed at this target.

Lipid homeostasis is tightly controlled during normal development and health; however, dysfunction in lipid homeostasis results in the development of diseases such as atherosclerosis, obesity, diabetes and cancer. Critical regulators in lipid homeostasis include a family of lipid sensing transcription factors known as Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs). PPARs are members of the steroid hormone/nuclear receptor subfamily that are activated by structurally diverse chemicals such as fatty acids, prostanoids, hypolipidemic drugs, non-steroidal anti-inflammatory drugs, insulin sensitizers and environmental pollutants (1,2). The first PPAR to be described, PPAR α , controls lipid metabolism in the liver and is activated by lipid lowering drugs such as clofibrate (3,4). Mice that have had the gene encoding PPAR α disrupted have a deficiency in their ability to metabolise and excrete hepatic lipid and the hepatocytes accumulate large lipid droplets in response to hypolipidemic drugs (4). Another isoform, PPAR γ , is required for the lipid stimulated development of adipocytes. PPAR γ is a high affinity nuclear receptor for prostanoids (5) and is the pharmacological target for the thiazolidinedione group of anti-diabetic agents such as rosiglitazone (BRL49653) (6), International Application Publication Number WO 94/05659 (SmithKline Beecham PLC). Genetic ablation of this gene is lethal (7).

The function of another form of PPAR, PPAR δ , remains unknown. PPAR δ has been reported to be expressed at very low levels in all tissues examined (8); however, we have now made the observations that PPAR δ is expressed selectively in cells of the monocyte/macrophage lineage and is upregulated, along with PPAR γ , during phorbol ester-induced macrophage differentiation. PPAR δ is a fatty acid sensor and is activated by the unsaturated fatty acids linoleic acid and oleic acid, and these fatty acids have been implicated as being important signalling compounds in the differentiation of monocytes (9,10,11). PPAR δ is not activated by fibrate drugs, such as clofibrate, or by thiazolidinediones such as BRL49653.

WO 97/28149 (Merck & Co. Inc.) describes PPAR δ agonists which are purported to be useful for raising high density lipoprotein (HDL) plasma levels in mammals, and for preventing, halting or slowing the progression of atherosclerotic cardiovascular diseases.

High fat diets are known to be a major factor in the development of atherosclerosis, and many drugs that are used in the treatment of atherosclerosis modify lipid metabolism. Lipids are physically associated with the pathology of atherosclerosis in the macrophage-derived foam cell which are highly activated macrophages that are filled with lipid droplets. These foam cells are present at high concentrations in vascular lesions known as plaques, that eventually burst and result in thrombotic blockage of the blood vessels. This blockage may be clinically represented as a heart attack, stroke or peripheral artery disease. We have now shown that mouse macrophages and human THP-1 monocytic cell line express PPAR δ when activated by phorbol esters. The

activated THP-1 cells become adherent and spread on plastic culture dishes. In the appropriate fatty acid conditions, these cells will fill with lipid as detected by Oil Red O staining and become foam cells. These cells express genes that are associated with foam cells *in vivo*, such as IL-1 β , TNF α , IGF-1, CD36, MCP-1 and thromboxane synthase. These cells provide a model of lipid-induced foam cell formation. This accumulation can be prevented by candidate anti-atherosclerosis drugs such as BRL49653, thus demonstrating an anti-atherosclerotic property of the drug and that the model is useful in identifying anti-atherosclerotic drugs. This assay can be performed in a microtitre plate format and the lipid staining quantitated optically in a microtitre plate reader.

Using a selectable expression vector we have modified THP-1 cells to express PPAR δ antisense RNA. This cell line grow normally in culture, however when treated with phorbol ester this cell line no longer differentiates. Trypan blue staining of this cell line after phorbol ester treatment reveals that the cells have died. Therefore inhibition of PPAR δ function has switched the response to inflammatory stimuli from differentiation to death. The atherosclerotic plaque is filled with highly activated macrophage derived foam cells, and local concentrations of inflammatory mediators is very high within the plaque. Without being bound by any theory, we believe that inhibition of PPAR δ function in foam cells within, for example, atheromatous lesions will be useful to initiate a self-destruct cascade within the plaque. Controlled removal of foam cells without inflammation or necrosis has recently been demonstrated as an efficacious method of promoting plaque regression, using anti-sense therapy against BCL-X (Pollman *et al* (1998) *Nature Medicine* 4, 222-227). The targeting of PPAR δ in the activated macrophage is, we believe, likely to be highly specific as it is a response that relies upon the specific phenotypic state of the activated foam cell.

One object of the invention is the provision of compounds, or screens for compounds, which interfere with the formation of the foam cell development, or lead to the controlled removal of potential foam cells. Such compounds are believed to be useful in the promotion of plaque regression, and therefore the reduction in risk of heart disease, stroke or thrombosis.

We have shown that PPAR δ fulfils a critical role in the activation of macrophages and that selective inhibition of PPAR δ activity can prevent foam cell formation.

We have also shown that PPAR γ agonists inhibit lipid accumulation and that PPAR δ and PPAR γ oppose each other in the process of foam cell formation.

A first aspect of the invention provides a method of preventing or reducing foam cell development from macrophages or other cells, or removing foam cells, the method comprising contacting said macrophages or other cells or foam cells with an effective amount of an inhibitor of PPAR δ activity.

Suitably, the macrophages or other cells are those involved in atherosclerotic pathology.

Although the method has use in relation to studying macrophages and foam cells in culture, the method is particularly suited to preventing or reducing foam cell development, or removing foam cells, *in vivo* in particular within the body of a human or other mammal. Foam cells are lipid-laden cells such as leukocytes, usually macrophages.

They have internalized lipids and store them as cytoplasmic droplets, which gives the cells their characteristic foamy appearance in light microscopy.

5 A second aspect of the invention provides a method of preventing or reducing foam cell development from macrophages or other cells, or removing foam cells, in a patient, the method comprising administering to the patient an effective amount of an inhibitor of PPAR δ activity.

Suitably, the macrophages or other cells are those involved in atherosclerotic pathology.

10 Cells which may develop into foam cells include not only macrophages but also smooth muscle cells. Preferably, the inhibitor of PPAR δ activity is one which prevents or reduces foam cell development from macrophages, or removes macrophage-derived foam cells. More preferably, the method is a method of preventing or reducing foam cell development from macrophages.

15 Without prejudice to any further aspects of the invention, and while not being bound by any theory concerning the invention, it is believed that the development of foam cells from macrophages is associated with various disease states and that an inhibitor of PPAR δ activity will prevent or reduce, at least to a desirable extent the development of foam cells from macrophages. The diseases which are associated with foam cell development include but are not limited to atherosclerosis, heart disease, stroke,
20 peripheral artery diseases, and angina.

The methods may also be used for the prevention of restenosis and for regression of atheroma.

25 The finding that inhibition of PPAR δ activity prevents the activation of macrophages would also suggest that the methods may also be used in the treatment of inflammatory disorders. Examples of inflammatory disorders include rheumatoid arthritis, systemic sclerosis, and lupus. In support of a rôle for PPAR δ in inflammation, the non-steroidal anti-inflammatory drug sulindac, which blocks PPAR δ transcriptional activity, is unable to prevent PMA (phorbolmyristate acetate)-induced epidermal hyperplasia and inflammation in PPAR δ -null mice (Peters J M *et al* (2000) Mol. and Cell
30 Biol., 20, 5119-5128).

Accordingly, in a further aspect, the invention provides a method of preventing or treating inflammatory disorders which method comprises administering to the patient an effective amount of an inhibitor of PPAR δ activity.

35 There are a wide variety of disorders that arise through the pathology of atherosclerosis and include angina, coronary heart disease, stroke, peripheral vascular disease, Alzheimer's disease, vascular dementia, systemic sclerosis and retinal vascular degeneration.

40 A third aspect of the invention provides a method of preventing or treating a vascular disease associated with plaque formation and/or thrombotic blockage of the blood vessels in a patient, the method comprising administering to the patient an effective amount of an inhibitor of PPAR δ activity. It is believed that the method of this invention is particularly suited to the prevention or treatment of atherosclerosis, coronary heart disease, stroke or peripheral heart disease.

We have shown that inhibition of PPAR δ activity inhibits PMA-stimulated proliferation of cells. Thus, a fourth aspect of the invention provides a method of preventing or reducing proliferation of cells, which method comprises contacting the cells with an inhibitor of PPAR δ activity. Cells which are stimulated to proliferate by PMA include skin cells, colon cells, breast cells and prostate cells. In support of the role of PPAR δ in tumorigenesis it has recently been demonstrated that non-steroidal anti-inflammatory agents exert their anti cancer activity in colon-derived cells via blockade of PPAR δ transcriptional activity and promoting apoptosis. (He T-C *et al.*, 1999 Cell, 99, 335-343)

PPAR δ is involved in the action of the tumour promoter, PMA.

Thus, a fifth aspect of the invention provides a method of treating or preventing cancer in a patient, the method comprising administering to the patient an effective amount of an inhibitor of PPAR δ activity.

The method of the invention is particularly suited for use in relation to cancers of the skin.

The method of the invention is also particularly suited for use in relation to cancers of the breast.

The method of the invention is also particularly suited for use in relation to cancers of the colon.

The method of the invention is also particularly suited for use in relation to cancers of the prostate.

A sixth aspect of the invention provides a method of treating or preventing Alzheimer's disease in a patient, the method comprising administering to the patient an effective amount of an inhibitor of PPAR δ activity.

Inhibition of PPAR δ may prevent neurodegeneration caused by glial cells that form foam cells during normal ageing. These foam cells are thought to be promoted by high fat diets (Mato M. *et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3269-3274 (1996)).

It is known that ApoE (apolipoprotein E) is protective in Alzheimer's diseases and we show in the Examples that ApoE is repressed by fatty acids and PPAR δ . Without being bound by any theory, we believe that this may be a mechanism by which high fat diets promote dementia, and antagonism of this process may be beneficial(Kalmijn S *et al Annals of Neurology* 42, 776-782 (1997)).

By "an effective amount of an inhibitor of PPAR δ activity" we include the meaning an amount which is effective to prevent or reduce foam cell development from macrophages or other cells, or remove foam cells and, in particular, an amount which is effective to prevent the disease (by which we include the prevention of the progression from an asymptomatic state to a symptomatic state) or treat the disease (by which we include ameliorating the symptoms and slowing its progression) to a clinically useful extent. An extent which is clinically useful may readily be determined by the physician.

By "an inhibitor of PPAR δ activity" we mean any suitable inhibitor which may reduce PPAR δ activity in the cell, for example in the cell of a patient. It is particularly preferred that the inhibitor of PPAR δ activity is one which inhibits PPAR δ activity in a

macrophage cell or a foam cell derived from a macrophage cell. The term "inhibitor of PPAR δ activity" includes compounds which block the effect of PPAR δ agonists.

It is preferred if the inhibitor of PPAR δ activity is selective for PPAR δ . In particular, it is preferred that the inhibitor is effective in inhibiting PPAR δ activity but is substantially incapable of inhibiting the activity of other PPAR isoforms such as PPAR α or PPAR γ . Although it is preferred that the inhibitor of PPAR δ activity does not modify the activity of other PPAR isoforms, it may be advantageous if the molecule is an agonist or activator of PPAR γ activity. It is also preferred if the inhibitor of PPAR δ activity does not modify the activity of other steroid hormone receptor family receptors. By "selective" we mean that the compound is at least ten-fold more effective in inhibiting PPAR δ activity than it is in modifying the activity of another PPAR isoform. Preferably it is at least 100-fold more selective.

The inhibitor may be one which prevents the expression of PPAR δ in a cell. By "prevents the expression" we mean substantially prevents expression or at least reduces the level of expression of PPAR δ to a useful extent. Typically, the compound which prevents the expression of PPAR δ in a cell is a nucleic-acid based molecule.

As is shown in the Examples, we have demonstrated that the use of the antisense of the entire human PPAR δ coding sequence, including portions of untranslated regions, is able to inhibit foam cell formation from macrophages. It will be appreciated that smaller portions of the PPAR δ cDNA may be used as antisense agents, especially those corresponding to the start of translation of the PPAR δ protein.

Antisense molecules may be designed by reference to the PPAR δ sequence, the human cDNA sequence of which is given in Schmidt *et al* (1992) *Mol. Endocrinol.* 6, 1634-1641 and in GenBank Accession No. L07592.

PPAR δ antisense agents include agents which bind to PPAR δ mRNA and, preferably, inhibits its translation. By "antisense agent" we also include nucleic acid based molecules which are able to form triplexes with PPAR δ genomic sequence and prevent selectively transcription or translation of the gene.

The antisense molecule may be RNA (in which case it is transcribed from a vector designed to produce antisense transcripts) or it may be DNA or DNA-like molecules, such as antisense oligonucleotides.

It is believed that over-expression of anti-sense RNA from suitable portions of human genomic sequences corresponding to positions 67886 to 139948 of the human PAC clone No. 109F14 will be effective in inhibiting PPAR δ activity. PAC Clone No. 109F14 is available from the HGMP Resource Centre, Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SB, UK. PPAR δ gene sequence has Accession No. AL022721.

Antisense oligonucleotides can be designed by reference to the PPAR δ cDNA or gene sequence.

Oligonucleotides are subject to being degraded or inactivated by cellular endogenous nucleases. To counter this problem, it is possible to use modified oligonucleotides, eg having altered internucleotide linkages, in which the naturally occurring phosphodiester linkages have been replaced with another linkage. For example, Agrawal *et al* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7079-7083 showed increased inhibition in tissue culture of HIV-1

using oligonucleotide phosphoramidates and phosphorothioates. Sarin *et al* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7448-7451 demonstrated increased inhibition of HIV-1 using oligonucleotide methylphosphonates. Agrawal *et al* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7790-7794 showed inhibition of HIV-1 replication in both early-infected and chronically infected cell cultures, using nucleotide sequence-specific oligonucleotide phosphorothioates. Leither *et al* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3430-3434 report inhibition in tissue culture of influenza virus replication by oligonucleotide phosphorothioates.

Oligonucleotides having artificial linkages have been shown to be resistant to degradation *in vivo*. For example, Shaw *et al* (1991) in *Nucleic Acids Res.* 19, 747-750, report that otherwise unmodified oligonucleotides become more resistant to nucleases *in vivo* when they are blocked at the 3' end by certain capping structures and that uncapped oligonucleotide phosphorothioates are not degraded *in vivo*.

A detailed description of the H-phosphonate approach to synthesizing oligonucleoside phosphorothioates is provided in Agrawal and Tang (1990) *Tetrahedron Letters* 31, 7541-7544, the teachings of which are hereby incorporated herein by reference. Syntheses of oligonucleoside methylphosphonates, phosphorodithioates, phosphoramidates, phosphate esters, bridged phosphoramidates and bridge phosphorothioates are known in the art. See, for example, Agrawal and Goodchild (1987) *Tetrahedron Letters* 28, 3539; Nielsen *et al* (1988) *Tetrahedron Letters* 29, 2911; Jager *et al* (1988) *Biochemistry* 27, 7237; Uznanski *et al* (1987) *Tetrahedron Letters* 28, 3401; Bannwarth (1988) *Helv. Chim. Acta.* 71, 1517; Crosstick and Vyle (1989) *Tetrahedron Letters* 30, 4693; Agrawal *et al* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1401-1405, the teachings of which are incorporated herein by reference. Other methods for synthesis or production also are possible. In a preferred embodiment the oligonucleotide is a deoxyribonucleic acid (DNA), although ribonucleic acid (RNA) sequences may also be synthesized and applied.

The oligonucleotides useful in the invention preferably are designed to resist degradation by endogenous nucleolytic enzymes. *In vivo* degradation of oligonucleotides produces oligonucleotide breakdown products of reduced length. Such breakdown products are more likely to engage in non-specific hybridization and are less likely to be effective, relative to their full-length counterparts. Thus, it is desirable to use oligonucleotides that are resistant to degradation in the body and which are able to reach the targeted cells. The present oligonucleotides can be rendered more resistant to degradation *in vivo* by substituting one or more internal artificial internucleotide linkages for the native phosphodiester linkages, for example, by replacing phosphate with sulphur in the linkage. Examples of linkages that may be used include phosphorothioates, methylphosphonates, sulphone, sulphate, ketyl, phosphorodithioates, various phosphoramidates, phosphate esters, bridged phosphorothioates and bridged phosphoramidates. Such examples are illustrative, rather than limiting, since other internucleotide linkages are known in the art. See, for example, Cohen, (1990) *Trends in Biotechnology*. The synthesis of oligonucleotides having one or more of these linkages substituted for the phosphodiester internucleotide linkages is well known in the art, including synthetic pathways for producing oligonucleotides having mixed internucleotide linkages.

Oligonucleotides can be made resistant to extension by endogenous enzymes by "capping" or incorporating similar groups on the 5' or 3' terminal nucleotides. A reagent for capping is commercially available as Amino-Link IITM from Applied BioSystems Inc, Foster City, CA. Methods for capping are described, for example, by Shaw *et al* (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 747-750 and Agrawal *et al* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**(17), 7595-7599, the teachings of which are hereby incorporated herein by reference.

A further method of making oligonucleotides resistant to nuclease attack is for them to be "self-stabilized" as described by Tang *et al* (1993) *Nucl. Acids Res.* **21**, 2729-2735 incorporated herein by reference. Self-stabilized oligonucleotides have hairpin loop structures at their 3' ends, and show increased resistance to degradation by snake venom phosphodiesterase, DNA polymerase I and fetal bovine serum. The self-stabilized region of the oligonucleotide does not interfere in hybridization with complementary nucleic acids, and pharmacokinetic and stability studies in mice have shown increased *in vivo* persistence of self-stabilized oligonucleotides with respect to their linear counterparts.

In accordance with the invention, the inherent binding specificity of antisense oligonucleotides characteristic of base pairing is enhanced by limiting the availability of the antisense compound to its intended locus *in vivo*, permitting lower dosages to be used and minimizing systemic effects. Thus, oligonucleotides are applied locally to achieve the desired effect. The concentration of the oligonucleotides at the desired locus is much higher than if the oligonucleotides were administered systemically, and the therapeutic effect can be achieved using a significantly lower total amount. The local high concentration of oligonucleotides enhances penetration of the targeted cells and effectively blocks translation of the target nucleic acid sequences.

The oligonucleotides can be delivered to the locus by any means appropriate for localized administration of a drug. For example, a solution of the oligonucleotides can be injected directly to the site or can be delivered by infusion using an infusion pump. The oligonucleotides also can be incorporated into an implantable device which when placed at the desired site, permits the oligonucleotides to be released into the surrounding locus.

The oligonucleotides are most preferably administered *via* a hydrogel material. The hydrogel is noninflammatory and biodegradable. Many such materials now are known, including those made from natural and synthetic polymers. In a preferred embodiment, the method exploits a hydrogel which is liquid below body temperature but gels to form a shape-retaining semisolid hydrogel at or near body temperature. Preferred hydrogels are polymers of ethylene oxide-propylene oxide repeating units. The properties of the polymer are dependent on the molecular weight of the polymer and the relative percentage of polyethylene oxide and polypropylene oxide in the polymer. Preferred hydrogels contain from about 10 to about 80% by weight ethylene oxide and from about 20 to about 90% by weight propylene oxide. A particularly preferred hydrogel contains about 70% polyethylene oxide and 30% polypropylene oxide. Hydrogels which can be used are available, for example, from BASF Corp., Parsippany, NJ, under the tradename PluronicTM.

In this embodiment, the hydrogel is cooled to a liquid state and the oligonucleotides are admixed into the liquid to a concentration of about 1mg oligonucleotide per gram of hydrogel. The resulting mixture then is applied onto the surface to be treated, for example

by spraying or painting during surgery or using a catheter or endoscopic procedures. As the polymer warms, it solidifies to form a gel, and the oligonucleotides diffuse out of the gel into the surrounding cells over a period of time defined by the exact composition of the gel.

The oligonucleotides can be administered by means of other implants that are commercially available or described in the scientific literature, including liposomes, microcapsules and implantable devices. For example, implants made of biodegradable materials such as polyanhydrides, polyorthoesters, polylactic acid and polyglycolic acid and copolymers thereof, collagen, and protein polymers, or non-biodegradable materials such as ethylenevinyl acetate (EVAc), polyvinyl acetate, ethylene vinyl alcohol, and derivatives thereof can be used to locally deliver the oligonucleotides. The oligonucleotides can be incorporated into the material as it is polymerized or solidified, using melt or solvent evaporation techniques, or mechanically mixed with the material. In one embodiment, the oligonucleotides are mixed into or applied onto coatings for implantable devices such as dextran coated silica beads, stents, or catheters.

The dose of oligonucleotides is dependent on the size of the oligonucleotides and the purpose for which it is administered. In general, the range is calculated based on the surface area of tissue to be treated. The effective dose of oligonucleotide is somewhat dependent on the length and chemical composition of the oligonucleotide but is generally in the range of about 30 to 3000 μ g per square centimetre of tissue surface area.

The oligonucleotides may be administered to the patient systemically for both therapeutic and prophylactic purposes. The oligonucleotides may be administered by any effective method, for example, parenterally (eg intravenously, subcutaneously, intramuscularly) or by oral, nasal or other means which permit the oligonucleotides to access and circulate in the patient's bloodstream. Oligonucleotides administered systemically preferably are given in addition to locally administered oligonucleotides, but also have utility in the absence of local administration. A dosage in the range of from about 0.1 to about 10 grams per administration to an adult human generally will be effective for this purpose.

In addition to the antisense agents described above, ribozymes, in particular hammerhead ribozymes, can be designed based on the PPAR δ cDNA or gene sequence which are believed to be useful as inhibitors of PPAR δ activity.

Ribozymes which may be encoded in the nucleic acid to be delivered to the target are described in Cech and Herschlag "Site-specific cleavage of single stranded DNA" US 5,180,818; Altman *et al* "Cleavage of targeted RNA by RNase P" US 5,168,053, Cantin *et al* "Ribozyme cleavage of HIV-1 RNA" US 5,149,796; Cech *et al* "RNA ribozyme restriction endoribonucleases and methods", US 5,116,742; Been *et al* "RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction endonucleases and methods", US 5,093,246; and Been *et al* "RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction endoribonucleases and methods; cleaves single-stranded RNA at specific site by transesterification", US 4,987,071, all incorporated herein by reference. Suitable targets for ribozymes include transcription factors such as c-fos and c-myc, and bcl-2. Durai *et al* (1997) *Anticancer Res.* 17, 3307-3312 describes a hammerhead ribozyme against bcl-2.

Genetic constructs which express the ribozymes or antisense compounds useful in the methods of the invention may readily be made. Suitably, the genetic constructs are ones which are adapted to deliver and express the ribozyme or antisense molecule in the target cell. Thus, the method of the invention comprises a method of gene therapy.

5 Gene therapy may be carried out according to generally accepted methods, for example, as described by Friedman, 1991. A virus or plasmid vector (see further details below), containing a copy of the gene encoding the ribozyme or antisense molecule linked to expression control elements and capable of replicating inside the target cells, is prepared. Suitable vectors are known, such as disclosed in US Patent 5,252,479 and
10 International Patent Application Publication Number WO 93/07282 (Boehringer Ingelheim International GmbH). The vector is then injected into the patient, either locally at the site of the target or systemically. If the transfected gene is not permanently incorporated into the genome of each of the targeted cells, the treatment may have to be repeated periodically.

15 Gene transfer systems known in the art may be useful in the practice of the gene therapy methods of the present invention. These include viral and nonviral transfer methods. A number of viruses have been used as gene transfer vectors, including papovaviruses, eg SV40 (Madzak *et al*, 1992), adenovirus (Berkner, 1992; Berkner *et al*, 1988; Gorziglia and Kapikian, 1992; Quantin *et al*, 1992; Rosenfeld *et al*, 1992;
20 Wilkinson *et al*, 1992; Stratford-Perricaudet *et al*, 1990), vaccinia virus (Moss, 1992), adeno-associated virus (Muzyczka, 1992; Ohi *et al*, 1990), herpesviruses including HSV and EBV (Margolskee, 1992; Johnson *et al*, 1992; Fink *et al*, 1992; Breakfield and Geller, 1987; Freese *et al*, 1990), and retroviruses of avian (Brandyopadhyay and Temin, 1984; Petropoulos *et al*, 1992), murine (Miller, 1992; Miller *et al*, 1985; Sorge *et al*,
25 1984; Mann and Baltimore, 1985; Miller *et al*, 1988), and human origin (Shimada *et al*, 1991; Helseth *et al*, 1990; Page *et al*, 1990; Buchschacher and Panganiban, 1992). To date most human gene therapy protocols have been based on disabled murine retroviruses. Lentivirus-based vectors are preferred.

Nonviral gene transfer methods known in the art include chemical techniques
30 such as calcium phosphate coprecipitation (Graham and van der Eb, 1973; Pellicer *et al*, 1980); mechanical techniques, for example microinjection (Anderson *et al*, 1980; Gordon *et al*, 1980; Brinster *et al*, 1981; Constantini and Lacy, 1981); membrane fusion-mediated transfer via liposomes (Felgner *et al*, 1987; Wang and Huang, 1989; Kaneda *et al*, 1989; Stewart *et al*, 1992; Nabel *et al*, 1990; Lim *et al*, 1992); and direct DNA uptake and
35 receptor-mediated DNA transfer (Wolff *et al*, 1990; Wu *et al*, 1991; Zenke *et al*, 1990; Wu *et al*, 1989b; Wolff *et al*, 1991; Wagner *et al*, 1990; Wagner *et al*, 1991; Cotten *et al*, 1990; Curiel *et al*, 1991a; Curiel *et al*, 1991b). Viral-mediated gene transfer can be combined with direct *in vivo* gene transfer using liposome delivery, allowing one to direct the viral vectors to the tumour cells and not into the surrounding nondividing cells.
40 Alternatively, the retroviral vector producer cell line can be injected into tumours (Culver *et al*, 1992). Injection of producer cells would then provide a continuous source of vector particles. This technique has been approved for use in humans with inoperable brain tumours.

Other suitable systems include the retroviral-adenoviral hybrid system described by Feng *et al* (1997) *Nature Biotechnology* 15, 866-870, or viral systems with targeting ligands such as suitable single chain Fv fragments.

In an approach which combines biological and physical gene transfer methods, plasmid DNA of any size is combined with a polylysine-conjugated antibody specific to the adenovirus hexon protein, and the resulting complex is bound to an adenovirus vector. The trimolecular complex is then used to infect cells. The adenovirus vector permits efficient binding, internalization, and degradation of the endosome before the coupled DNA is damaged.

Liposome/DNA complexes have been shown to be capable of mediating direct *in vivo* gene transfer. While in standard liposome preparations the gene transfer process is nonspecific, localized *in vivo* uptake and expression have been reported in tumour deposits, for example, following direct *in situ* administration (Nabel, 1992).

Gene transfer techniques which target DNA directly to macrophages is preferred. Receptor-mediated gene transfer, for example, is accomplished by the conjugation of DNA (usually in the form of covalently closed supercoiled plasmid) to a protein ligand *via* polylysine. Ligands are chosen on the basis of the presence of the corresponding ligand receptors on the cell surface of the target cell/tissue type. The mannose receptor is rather specific for macrophages and specific targeting of DNA/mannose conjugates has been demonstrated. These ligand-DNA conjugates can be injected directly into the blood if desired and are directed to the target tissue where receptor binding and internalization of the DNA-protein complex occurs. To overcome the problem of intracellular destruction of DNA, coinfection with adenovirus can be included to disrupt endosome function.

In a further embodiment, the compound is one which inhibits the activity of PPAR δ protein activity.

Suitable compounds may be selected using some of the methods described below.

It will be appreciated that the effective amount of an inhibitor of PPAR δ activity may be administered to the patient in any suitable way and in any suitable formulation. Suitability of any method of administration or of any formulation may readily be determined by the skilled person by reference to the nature of the inhibitor. For example nucleic acid-based inhibitors may be formulated and administered in different ways to small molecule-based inhibitors as is known in the art.

The aforementioned compounds of the invention or compounds for use in the methods of the invention or a formulation thereof may be administered by any conventional method including oral and parenteral (eg subcutaneous, intravenous, or intramuscular) injection. The treatment may consist of a single dose or a plurality of doses over a period of time.

Typical doses are expected to be in the range 0.01-20mg/kg.

Whilst it is possible for a compound of the invention to be administered alone, it is preferable to present it as a pharmaceutical formulation, together with one or more acceptable carriers. The carrier(s) must be "acceptable" in the sense of being compatible

with the compound of the invention and not deleterious to the recipients thereof. Typically, the carriers will be water or saline which will be sterile and pyrogen free.

The formulations may conveniently be presented in unit dosage form and may be prepared by any of the methods well known in the art of pharmacy. Such methods include the step of bringing into association the active ingredient (compound of the invention or compound for use in the methods of the invention) with the carrier which constitutes one or more accessory ingredients. In general the formulations are prepared by uniformly and intimately bringing into association the active ingredient with liquid carriers or finely divided solid carriers or both, and then, if necessary, shaping the product.

Formulations in accordance with the present invention suitable for oral administration may be presented as discrete units such as capsules, cachets or tablets, each containing a predetermined amount of the active ingredient; as a powder or granules; as a solution or a suspension in an aqueous liquid or a non-aqueous liquid; or as an oil-in-water liquid emulsion or a water-in-oil liquid emulsion. The active ingredient may also be presented as a bolus, electuary or paste.

A tablet may be made by compression or moulding, optionally with one or more accessory ingredients. Compressed tablets may be prepared by compressing in a suitable machine the active ingredient in a free-flowing form such as a powder or granules, optionally mixed with a binder (eg povidone, gelatin, hydroxypropylmethyl cellulose), lubricant, inert diluent, preservative, disintegrant (eg sodium starch glycolate, cross-linked povidone, cross-linked sodium carboxymethyl cellulose), surface-active or dispersing agent. Moulded tablets may be made by moulding in a suitable machine a mixture of the powdered compound moistened with an inert liquid diluent. The tablets may optionally be coated or scored and may be formulated so as to provide slow or controlled release of the active ingredient therein using, for example, hydroxypropylmethylcellulose in varying proportions to provide desired release profile.

Formulations suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous sterile injection solutions which may contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats and solutes which render the formulation isotonic with the blood of the intended recipient; and aqueous and non-aqueous sterile suspensions which may include suspending agents and thickening agents. The formulations may be presented in unit-dose or multi-dose containers, for example sealed ampoules and vials, and may be stored in a freeze-dried (lyophilised) condition requiring only the addition of the sterile liquid carrier, for example water for injections, immediately prior to use. Extemporaneous injection solutions and suspensions may be prepared from sterile powders, granules and tablets of the kind previously described.

Preferred unit dosage formulations are those containing a daily dose or unit, daily sub-dose or an appropriate fraction thereof, of an active ingredient.

It should be understood that in addition to the ingredients particularly mentioned above the formulations of this invention may include other agents conventional in the art having regard to the type of formulation in question, for example those suitable for oral administration may include flavouring agents.

The formulations mentioned herein are carried out using standard methods such as those described or referred to in reference texts such as the British and US

Pharmacopoeias, Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.), Martindale The Extra Pharmacopoeia (London, The Pharmaceutical Press).

The therapeutic methods of the invention may be used to treat any mammal including humans. Thus, it is envisaged that the method may be used to treat, by way of example, domestic animals such as cats and dogs, or farm animals such as horses, cows, sheep, goats and pigs, or other commercially important mammals. When the inhibitor of PPAR δ activity is a nucleic acid-based molecule it will be appreciated that it will be designed by reference to the mammal's PPAR δ gene or cDNA.

It is preferred that the patient to be treated is a human patient.

A further aspect of the invention provides an inhibitor of PPAR δ activity for use in medicine.

The inhibitor is packaged and presented for use in medicine. In particular, it may be packaged and presented for use in treating atherosclerosis, or in treating heart disease or treating stroke or treating peripheral artery disease or treating vascular disease associated with plaque formation or treating thrombotic blockage of blood vessels or treating Alzheimer's disease or treating cancer.

A still further aspect of the invention provides a pharmaceutical composition comprising an inhibitor of PPAR δ activity and a pharmaceutically-acceptable carrier.

Yet still further aspects of the invention provide use of an inhibitor of PPAR δ activity in the manufacture of a medicament for preventing or reducing foam cell development from macrophages or other cells, or removing foam cells, in a patient; use of an inhibitor of PPAR δ activity in the manufacture of a medicament for preventing or treating a vascular disease associated with plaque formation and/or thrombotic blockage of the blood vessels; use of an inhibitor of PPAR δ activity in the manufacture of a medicament for treating or preventing cancer; and use of an inhibitor of PPAR δ activity in the manufacture of a medicament for treating or preventing Alzheimer's disease.

Suitably, the macrophages or other cells are those involved in atherosclerotic pathology.

Until the present work, it was not envisaged that inhibitors of PPAR δ activity would be useful, particularly in medicine. The invention also includes methods of identifying compounds which inhibit PPAR δ activity and, in particular, which inhibit PPAR δ activity in macrophage cells or in foam cells. The compounds so-identified may themselves be useful in medicine or they may be useful as lead compounds for further development into medically useful compounds. These methods of the invention, or means for carrying out such methods, may be considered to be "drug screening methods" or "drug screening assays".

One aspect of the invention provides a method of identifying a compound which may, or which can be used as a lead compound to produce a compound which may, be useful in medicine the method comprising selecting a compound which inhibits PPAR δ activity. Typically, the method may involve the screening of a number of test compounds which are present in a library of test compounds. Thus, a further aspect of the invention provides a method of identifying a compound which inhibits PPAR δ activity the method

comprising selecting from a library of test compounds any compound which inhibits PPAR δ activity.

The above-mentioned methods may be used to select compounds which inhibit PPAR δ gene expression or the production of PPAR δ protein (ie translation) in a cell or which inhibit the PPAR δ protein activity.

Suitable assay formats are well known to the person skilled in the art, and some of them are described in more detail in Example 3.

In relation to identifying compounds which inhibit PPAR δ gene expression, a preferred embodiment involves using the PPAR δ gene promoter operatively linked to a reporter gene such as, for example, luciferase, β -galactosidase, alkaline phosphatase or the like. The expression of the reporter gene in a cell may be measured in the presence or absence of a test compound. Test compounds which selectively reduce the expression of the reporter gene are selected as compounds which may be useful in inhibiting or reducing expression of the PPAR δ gene so that there is inhibition of PPAR δ activity.

In relation to compounds which inhibit PPAR δ protein activity, one particular activity which it is desirable to inhibit is the ability of the PPAR δ protein to transcriptionally activate genes under its control. Thus, in one embodiment, a reporter gene, such as one of those listed above, is operatively linked to a promoter or enhancer sequence which is under the control of PPAR δ . Genes which are under the control of PPAR δ include CYP4A6, acyl CoA oxidase and lipoprotein lipase; thus, the promoters of these genes are believed to be useful in this embodiment of the invention. Synthetic enhancer elements derived from these genes, linked to heterologous promoters such as from the HSV thymidine kinase gene, may also be useful in this embodiment. A genetic construct containing the promoter or enhancer/reporter gene is transfected into a suitable cell such as a monocyte or macrophage cells. COS-1 or CV-1 cells, both sublines of African Green Monkey kidney cells, may also be used. A genetic construct encoding PPAR δ is also transfected into the cell and the ability of a test compound to inhibit the expression of the reporter gene is assessed. In a particularly preferred embodiment, the transfected cells would be incubated with a known PPAR δ agonist such as Compound F as disclosed on page 9 of WO 97/28149 (hereinafter referred to as Compound F) in combination with the test compound and the ability of the test compound to interfere with the action of the agonist would be determined. Compounds which reduce or inhibit the expression of the reporter gene are selected for further study.

In a further embodiment, a CARLA (co-activator/receptor/ligand interaction assay) may be used as described in Example 3. These assays rely on the dependence of the binding of co-receptors on the presence of a suitable ligand for PPAR δ . In the CARLA assays, an agonist is present and the ability of the test compound to interfere with the action of the agonist is assessed.

Particularly preferred compounds which may be selected by the methods of the invention are those which bind to the ligand binding portion of PPAR δ in a transcriptionally futile manner and thereby prevent the action of agonistic ligands of PPAR δ .

In one embodiment of the invention, it is preferred if a "pre-screening" step is carried out to identify compounds bind to PPAR δ before determining whether they are an inhibitor or antagonist of PPAR δ activity. Receptor-ligand binding assays are well known in the art and can readily be devised and executed by the suitably skilled person.

5 In a further, preferred embodiment, a "pre-screening" step may be carried out which is essentially the foam cell assay described below. Thus, in this way compounds may be selected which are active in preventing or reducing foam cell development from macrophages or other cells or remove foam cells, and which are inhibitors of PPAR δ .

10 Suitably, the macrophages or other cells are those involved in atherosclerotic pathology.

In a further embodiment, PPAR δ inhibitors may be identified using a two-hybrid approach to monitor the interaction of PPAR δ and co-activators such as SRC-1. In this case, PPAR α (or a functional portion thereof) is fused to a DNA binding protein (such as the DNA binding domain of GAL4) and the co-activator molecule or a functional portion thereof (such as SRC-1) would be fused to a transactivating protein (such as the transactivation domain of VP16). Yeast expressing both of these fusions and having an integrated reporter gene (such as β -galactosidase) under the control of a DNA binding protein-dependent (eg GAL4-dependent) promoter are generated.

20 The yeast are grown in the presence of a PPAR δ agonist and a wide range of test compounds. Cultures with low β -galactosidase activity indicate the presence of a PPAR δ antagonist.

It will be appreciated that the methods of identifying a compound as described above are useful in identifying compounds which may, or which can be used as a lead compound to produce a compound which may, (1) prevent or reduce foam cell development from macrophages or remove foam cells, (2) prevent or be useful in treating a vascular disease associated with plaque formation and/or thrombotic blockage of the blood vessels, (3) prevent or be useful in treating cancer, or (4) prevent or be useful in treating Alzheimer's disease.

30 In further embodiments of the invention once a compound has been selected for its ability to inhibit or reduce PPAR δ activity, it may conveniently be used in a further screen to determine, for example, whether it may prevent or reduce foam cell development from macrophages or other cells, or remove foam cells, whether it may prevent or is useful in treating a vascular disease associated with plaque formation and/or thrombotic blockage of the blood vessels, or prevent or is useful in treating cancer, or prevent or is useful in treating Alzheimer's disease.

35 Suitably, the macrophages or other cells are those involved in atherosclerotic pathology.

Screening methods to determine these properties are known from this application (in relation to foam cell development from macrophages) or are known in the art.

40 Other, further, useful screens may be carried out on the selected compound to determine, for example, its solubility, its pharmacological profile and drug metabolism profile. Similarly, screens may be carried out to determine the compounds selectivity for inhibiting PPAR δ activity. For example, screens may be carried out to determine

whether a particular compound may modify the activity of another PPAR isoform. Typically, it is preferred if compounds are selected which substantially do not modify the activity of other PPAR isoforms. However, it may be advantageous if the compound which is selected is one which inhibits PPAR δ activity but is an agonist or activator of PPAR γ activity. Equally, it may be advantageous if the compound which is selected is one which inhibits PPAR δ activity but is an activator or agonist of PPAR α activity.

The compound selected in the screening methods of the invention may be a "drug-like compound".

The term "drug-like compound" is well known to those skilled in the art, and may include the meaning of a compound that has characteristics that may make it suitable for use in medicine, for example as the active ingredient in a medicament. Thus, for example, a drug-like compound may be a molecule that may be synthesised by the techniques of organic chemistry, less preferably by techniques of molecular biology or biochemistry, and is preferably a small molecule, which may be of less than 5000 daltons molecular weight and which may be water-soluble. A drug-like compound may additionally exhibit features of selective interaction with a particular protein or proteins and be bioavailable and/or able to penetrate target cellular membranes, but it will be appreciated that these features are not essential.

The term "lead compound" is similarly well known to those skilled in the art, and may include the meaning that the compound, whilst not itself suitable for use as a drug (for example because it is only weakly potent against its intended target, non-selective in its action, unstable, poorly soluble, difficult to synthesise or has poor bioavailability) may provide a starting-point for the design of other compounds that may have more desirable characteristics.

The terms "drug-like compound" and "lead compound" typically refer to relatively small organic molecules rather than, for example, relatively large nucleic acid-based molecules. Nevertheless, it will be appreciated that many embodiments of the screening methods of the invention are suitable for identifying nucleic acid-based molecules, particularly those which inhibit expression of the PPAR δ gene or translation of the PPAR δ protein.

As is well known in the art of drug discovery, a lead compound found in a screen may be modified and the modified compound screened to determine its activity.

The invention also relates to an *in vitro* model for dietary fat-induced foam cell formation and its use in identifying useful compounds.

Foam cell formation is in the first step a two step process wherein the cell is converted into a foam cell precursor by being subjected to an inflammatory stimulus such as PMA or by being brought into contact with a suitable growth factor such as GMCSF (Granulocyte macrophage colony stimulating factor). In the second step the precursor cells become foam cells in the presence of a suitable concentration of fatty acids.

Thus, a further aspect of the invention provides a method of identifying a compound which may, or which can be used as a lead compound to produce a compound which may, (1) prevent or reduce foam cell development from macrophages or other cells, suitably those macrophages or other cells involved in atherosclerotic pathology, or

remove foam cells or (2) prevent or be useful in treating a vascular disease associated with plaque formation and/or thrombotic blockage of the blood vessels, the method comprising the steps of selecting:

- (a) a suitable primary cell population or cell line,
- 5 (b) supplying to the cell line an inflammatory stimulus or growth factor which facilitates differentiation to a foam cell precursor,
- (c) supplying to the foam cell precursor a suitable concentration of fatty acid, and
- (d) measuring the accumulation of fatty acid in the cell in the presence or absence of the compound.

10 A suitable primary cell population or cell line is that involved in atherosclerotic pathology.

The cell type may be any suitable cell type. Preferably, it is a leukocyte cell. It is particularly preferred that the leukocyte cell line is a macrophage or macrophage precursor cell line.

15 Typically, the cells are THP-1 or U937. THP-1 is available as ECACC cell deposit No. 85011440, and U937 is available as ECACC cell deposit No. 88081201. However, any suitable leukocyte cell may be used, although it is preferred if a monocytic or macrophage-like cell is used. THP-1 cells are "monocyte-like" and can be differentiated to macrophage-like cells by phorbol ester (PMA).

20 By "supplying an inflammatory stimulus to the cell" we include the supply of any suitable inflammatory stimulus which facilitates stimulation of the cells into foam cells.

By "growth factor which facilitates the differentiation to foam cells" we include any suitable growth factor such as GM-CSF and, in the context of the invention, PMA. PMA or a functionally equivalent phorbol ester is preferred.

25 Typically, the phorbol ester is PMA but it may be any suitable phorbol ester which facilitates the differentiation of the cells.

Typically, PMA is used at a concentration of between 0.1 to 10 ng/ml.

The fatty acid may be supplied to the cell in the serum in which the cell is growing. We have found that heat inactivated fetal calf serum from Gibco BRL gives a low
30 background of lipid accumulation, whereas a high level of lipid accumulation is achieved using Controlled Process Serum Replacement (CPSR-3) from Sigma. Alternatively, it may be supplied (for example by adding to the growth culture medium) in a suitable concentration. Suitable fatty acids include mono- and polyunsaturated fatty acids of chain lengths 18-22, including linoleic acid. Suitably, the fatty acids are supplied at a
35 concentration of between 10 to 100 μ M.

Accumulation of fatty acid in the cell may be measured using any suitable method. Particularly convenient methods involve the use of fatty acid stains such as Nile Red or Oil Red O which can be used *in situ* and read with a plate reader. Other methods which can be used to measure accumulation of fatty acids include TLC, HPLC, and LC-MS.

40 The accumulation of fatty acid in the cell in the presence or absence of test compound is assessed and compounds which lead to a reduction in the accumulation of fatty acid in the cell are selected for further testing.

It will readily be appreciated that since the cells can be grown in multi-cell culture dishes (eg 64 cell culture dishes) and since the lipid staining can be quantitated, for example optically in a microtitre plate reader, the screening method may readily be automated for high throughput screening.

5 Further aspects of the invention provide compounds identifiable by the screening methods of the invention; such compounds identifiable by these methods of the invention for use in medicine; and pharmaceutical compositions of such compounds further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.

10 The compounds identified and identifiable by the screening methods of the invention are believed to be useful in the methods of treatments of the invention.

The invention will now be described in more detail by reference to the following Description, Examples and Figures wherein:

Figure 1 shows the expression of PPARs in THP-1 cells. RNAase expression analysis for PPAR α and δ mRNAs was performed on total RNA from mouse and human liver and several human cell lines. The Huh7 cell line is a human liver cell line that contains identical amounts of PPAR δ (black bars) and α (white bars) mRNA when compared to total RNA isolated from human liver (>1% of actin). Both Huh7 and human liver do not respond to peroxisome proliferators in terms of increases in lipid metabolism and transcription from PPRE containing reporter constructs. Monocytic cell lines such as U937 and THP-1 cells express relatively high levels of PPAR δ (5-6% of actin). Other human tissues were analysed for α and δ expression such as colon, ovary, testes, kidney, adrenal. In all cases the expression levels were less than 1% of actin (data not shown). However, it is possible that individual cell components of these complex tissues express significant levels of these receptors.

25 **Figure 2** shows atherogenic gene expression in THP-1 cells. Total RNA from THP-1 cells was analysed by RT-PCR for the expression of various gene products associated with the atherogenic process. Shown are ethidium bromide-stained agarose gels of the analysis of THP-1 cells in the normal growing conditions (-PMA), adherent THP-1 cells after phorbol ester treatment (+PMA) and phorbol ester treatment in the presence of 100 μ M linoleic acid. All probes were designed to cross intron/exon boundaries and did not amplify genomic DNA.

30 **Figure 3** shows that fatty acids and rexinoids promote the formation of foam cells that are inhibited by rosiglitazone. Rexinoids are drugs specific for RXR, such as 9-cis-retinoic acid and the Ligand Pharmaceutical compound, LG100268 (Mukherjee R *et al.*, 1997 Nature 386, 407-410). Rosiglitazone is made by SmithKline Beecham and is also known as Avandia and BRL49653.

A. Fatty acid co-operate with rexinoids in foam cell formation.

40 THP-1 cells were treated with 5ng/ml PMA and DMSO (dimethyl sulfoxide; 0.5%), linoleic acid (30 μ M), LG 100268 (5 μ M) and linoleic acid with LG 100268. Treatment was continued for 3 days and the cells fixed in 0.66M paraformaldehyde, stained with a saturating solution of Oil Red O and then counterstained with haematoxylin. Increased lipid accumulation is observed with treatment with either linoleic acid or LG 100268. Addition of both compounds produces an additive effect on lipid accumulation.

B. Rosiglitazone promotes lipid clearance.

PMA treated THP-1 cells were treated with 20 μ M BRL49653 for 3 days and stained for lipid accumulation as described above.

Figure 4 shows that rosiglitazone modulates gene expression in THP-1 cells.

5 *A. IL-1 β expression is reduced by rosiglitazone.*

RNase protection analysis of interleukin 1 β mRNA levels in PMA treated THP-1 cells (+PMA), PMA and linoleic acid treated cells (+PMA+FA), and PMA and BRL49653 treated cells (+PMA+BRL). Also shown is the actin normalisation signal.

B. TNF α expression is reduced by rosiglitazone.

10 RNase protection analysis of TNF α mRNA levels in control THP-1 cells (-PMA), PMA treated cells (+PMA), PMA and linoleic acid treated cells (+PMA+FA), and PMA and BRL49653 treated cells (+PMA+BRL). Also shown is the actin normalisation signal.

C. CD36 expression is increased by rosiglitazone.

15 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) analysis of CD36 antigen expression in control THP-1 cells (-PMA), and PMA and BRL49653 treated cells (+PMA+BRL). Treatment was for 48 hours at 50 μ M BRL49653. Cells were scraped from the culture plates, fixed and incubated with a FITC (fluorescein isothiocyanate) conjugated CD36 antibody (Coulter Immunotech). FACS analysis was performed using a Coulter EPIC V cell sorter.

20 **Figure 5** shows the generation of cell lines constitutively expressing PPAR δ . The entire coding sequence of human PPAR δ was subcloned into the eukaryotic expression vector pCLDN (Brighty D W *et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7802-7805 (1991)). The resulting plasmids were transfected into THP-1 cells using a modified DEAE-Dextran procedure (Fujita *et al* (1986) *Cell* 46, 401-407). The cells were maintained in
25 medium containing 1mg/ml G418 and 10% THP-1 conditioned medium, with rigorous washing procedures to remove dead cells. This was continued until cell killing stopped and robust growth was observed. We obtained 6 lines each of pCLDN (empty vector) pCLDNPPAR δ , pCLDNPPAR δ AS, pCLDNPPAR α and pCLDNPPAR α AS. "AS" means antisense construct. All of these cell lines were essentially identical in growth and
30 viability. Initial differentiation experiments were performed with the PPAR δ cell lines in the selection medium. These were negative for all constructs including the empty vector control line. The cells for all constructs were still alive after PMA treatment apart from the PPAR δ anti-sense lines which all showed trypan blue uptake. The cells were then cultured without G418 until the empty vector control lines responded to PMA in a similar
35 fashion to the parental control. This then revealed that the pCLDNPPAR δ lines all differentiated in a similar fashion but the pCLDNPPAR δ AS lines all failed to differentiate.

40 RNA and protein was prepared from the PPAR δ sense cell lines and analysed for PPAR δ mRNA by RNase protection (B) and for PPAR δ protein by western blotting (C). All 6 lines expressed >10 fold increases in PPAR δ mRNA over the parental cell line. These levels are far in excess of those observed in PMA treated cells. High levels of PPAR δ protein have been seen in lines designated delta-1 and delta-2. The other 4 lines have not

been analysed by western blotting. All subsequent experiments were performed on these lines.

Figure 6 shows that PPAR δ over-expression promotes foam cell formation.

5 A. Parental THP-1 cells and pCLDNPPAR δ cells were treated with 5ng/ml PMA and DMSO (0.5%) or BRL49653 (50 μ M). Treatment was continued for 3 days and the cells fixed in 0.66M paraformaldehyde, stained with a saturating solution of Oil Red O and then counterstained with haematoxylin. Subsequent experiments have shown BRL49653 action to be effective at submicromolar concentrations.

10 B. Cultures were treated as above and then extracted with methanol/chloroform/PBS (1:1:1 vol/vol). The organic phase was run on a silica gel TLC plate (Merck:Kieselgel 60 with concentration zone) with heptane (80%), diethyl ether (18%) and acetic acid (2%) as the solvent. The lipids were then stained with an aerosol of phosphomolybdic acid in methanol. Shown is the relative mobility of free cholesterol (FCHOL), free arachidonic acid (FFA), highly unsaturated triacylglycerol (TG), fatty acid methyl esters (FAME),
15 cholesterol esters (CE) and also butylated hydroxyanisole (BHT) that is present in the solvent system.

Figure 7 shows that fatty acid efflux is repressed in activated PPAR δ over-expressing cells.

A. *Fatty acid uptake.*

20 1 million cells in 2ml of medium were incubated with 5 μ Ci of 3 H-oleic acid overnight with or without 100 μ M linoleic acid (HIGH FAT and LOW FAT respectively). The cells were then pelleted, washed and resuspended in fresh medium without labelled fatty acids. The percentage incorporation was determined by scintillation counting of an aliquot of the medium and the washed cells. All assays were performed in triplicate.

25 B. *Fatty acid efflux.*

The washed cells were incubated for a further 50 hours and the release of radioactivity was monitored over time. Parental cells in high fat are shown as diamonds and in low fat are shown as squares. PPAR δ over-expressing cells in high fat are shown as triangles and in low fat as circles.

30 C. *Fatty acid efflux of PMA activated cells.*

Cells were treated with PMA and incubated with radiolabelled oleic acid as described above. The adherent cells were washed and the release of radioactivity from these cells was measured over time. The parental cell line (squares) displays higher levels of radioactivity release than the PPAR δ over-expressing cells (diamonds).

35 **Figure 8** shows that ApoE gene expression is regulated by fatty acids through PPAR δ .

Total RNA was prepared from parental THP-1 cells treated with PMA (THP-1), or PMA and linoleic acid (THP-1+FA), and untreated PPAR δ over-expressing cell line (DELTA). cDNA was prepared from these RNA samples and the cDNA was analysed
40 for ApoE sequences using TAQMAN procedures. The result shown is relative expression normalised for β -actin expression and the error bars represent the standard deviation in duplicate samples.

Figure 9 shows that inhibition of PPAR δ prevents foam cell formation. Cells were treated overnight with 5ng/ml PMA and scored for differentiation (adherence to culture dish) and viability (trypan blue exclusion). The parental THP-1 cells and PPAR δ over-expressing cells (Sense) differentiate well in the presence of PMA. However, the PPAR δ antisense expressing cells (Anti-sense) do not differentiate at all and become highly permeant to trypan blue. These PPAR δ anti-sense cells grow normally with high viability in the absence of PMA.

Figure 10 shows that PPAR δ protection from death is not downstream of PKC. Parental and PPAR δ anti-sense cells were incubated with PMA and an inhibitor of PKC activity (Bis) and two inhibitors of PLA2 activity (OBAA and mepacrine). These inhibitors were included at concentrations used in previous studies for specific inhibition.

Bis is bisindoylmaleamide I and is available from Sigma. OBAA is 3-(4-octadecyl)benzoylacrylic acid and is available from Calbiochem. Mepacrine is 6-chloro-9-[(4-diethylamino)-1-methyl butyl]amino-2-methoxy-acridine and is available from Calbiochem.

All inhibitors prevented the differentiation of parental THP-1 cells (A). This confirmed the role of PKC in the action of phorbol ester. The action of the PLA2 inhibitors appears to reveal new aspects of the macrophage differentiation. However, when we examined the viability of these cells by trypan blue exclusion (B) we found that they did not block the PMA-induced "death" of the PPAR δ anti-sense cell line (black bars). Only mepacrine appeared to have any sign of toxicity in the parental cells (white bars).

Figure 11 shows that lipid accumulation is promoted by an agonist for PPAR δ , Compound F.

Figure 12 shows that Compound F, a PPAR δ agonist, promotes macrophage foam cell formation from THP-1 glial cells.

Figure 13 shows that Compound F promotes macrophage foam cell formation from primary human monocytes.

Figure 14 shows lipid accumulation in glial cells promoted by PPAR δ .

Figure 15: shows that Compound F stimulates proliferation of prostate cancer cell lines.

Description: The rôle of PPAR δ in the formation of foam cells.

Tissue culture

Human glioblastoma astrocytoma U373 cells were grown in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% v/v heat-inactivated foetal bovine serum (GibcoBRL, Paisley, Scotland), penicillin (5000IU/ml) (GibcoBRL, Paisley, Scotland) and streptomycin (5000 μ g/ml) (Gibco, Paisley, Scotland). The cultures were grown at 37°C and 5% CO₂ and passaged when 100% confluency was achieved.

Drug treatment of the cell lines

Confluent cells were plated in six-well test plates in 2ml of the medium used for the tissue culture detailed above and treated with 5 μ M and 10 μ M of the PPAR δ -specific

agonist Compound F. DMSO was used as a control. The Compound and medium were renewed every three days and the cells treated for one week.

Staining experiments

5 Oil Red O staining with haematoxylin counterstaining experiments were performed on cells from each of the treatments described in the paragraph above. The medium was discarded and the wells washed with PBS (2ml). The cells were fixed in 10% formalin (1ml) for one hour and then washed twice in PBS before brief rinsing in 60% *iso*-propyl alcohol. Oil Red O solution (1ml) (Sigma) was added and removed after
10 three hours. The wells were then washed twice with PBS. For the counterstaining, haematoxylin counterstain (1:10, 1mL) (Sigma) was added and removed after five minutes by washing twice with PBS. The second wash was left in the wells.

Results

15 After one week, the control cells showed no lipid accumulation. For the cells treated with Compound F, lipid accumulation was observed and was notably macrovesicular i.e. lipid accumulation was present not only in the perinuclear area but also in the astrocytic processes (see Figure 14).

20 Example 1: The role of PPAR δ in the formation of atherosclerotic foam cells.

Activated macrophages express all three forms of peroxisome proliferator activated receptor, namely alpha (α), gamma (γ), and delta (δ). In the work described in Example 1 we demonstrate that expression of PPAR δ is required for macrophage
25 activation by phorbol esters and that PPAR δ promotes macrophage foam cell formation. It has previously been shown that PPAR γ agonists negatively regulate macrophage activation and have profound anti-inflammatory actions. In this Example we show that the PPAR γ agonist, rosiglitazone, inhibits macrophage foam cell formation. Therefore, PPAR γ and PPAR δ mediate opposing roles in macrophage lipid metabolism and
30 differentiation. These results indicate that, surprisingly, antagonistic ligands for PPAR δ are strong candidates as drugs for the prevention of cardiovascular disease. Experimental materials and methods are described in the Figure legends.

35 Results

Validation of foam cell model

Monocytic cell lines are widely used in basic research into the molecular basis of atherogenesis. We have investigated the influence of lipids and dietary fat, and the influence of stress and inflammation. The most versatile cell line for this research is the
40 human cell line THP-1. This cell line grows in suspension under normal conditions, however inflammatory stimuli such as phorbol esters provoke a powerful differentiation and inflammatory response where the cells become adherent and more "macrophage like". This cell line is also known to respond to fatty acids and oxidised LDL by changes

in gene expression, and oxidised LDL has been shown to promote cytoplasmic lipid accumulation. These regulatory phenomenon are viewed as representing the initial events that occur in atherosclerotic plaque formation (12).

We have now found an important link between the inflammatory process and the lipid pathology of these cells with the observation that phorbol ester stimulation of THP-1 cells leads to a large increase in the levels of PPAR δ mRNA. Other groups have shown that inflammatory stimuli upregulate the expression of PPAR γ in mouse and human macrophages, as well as monocyte derived cell lines such as THP-1 and U937 (13-15). PPAR δ has also been shown to be expressed in thioglycolate-elicited peritoneal macrophages from mice (13). We have also demonstrated that activated THP-1 cells express many inflammatory gene products associated with atherogenesis such as MCP (monocyte chemoattractant protein), IL-8, IL-1 β and thromboxane synthase (Figure 2), and have found that the expression of several of these gene products upon activation is modulated by fatty acids. The finding that the expression of apolipoprotein E increases upon activation and that this is severely repressed by fatty acids is significant. These results demonstrate that this system responds to fatty acids and inflammatory stimuli in a suitable manner for it to be considered a good model for human vascular disease. We also observed that treatment of adherent THP-1 cells with polyunsaturated fatty acids, such as linoleic acid, leads to the accumulation of lipid droplets in the cytoplasm (Figure 3A). These lipid laden macrophages are known as foam cells. The involvement of a PPAR/RXR heterodimer in the regulation of foam cell formation was suggested by the observation that an activating ligand for the retinoid X receptor (LG100268) promoted foam cell formation in co-operation with fatty acids. Linoleic acid is not a very specific ligand for PPAR's, however it has been shown to activate PPAR alpha and delta efficiently, whereas it is a rather poor activator of PPAR γ . Treatment of these cells with the PPAR α activator Wy14,643 had no effect, consistent with the low expression of this isoform in the activated macrophage (Figure 1). The use of rosiglitazone, BRL49653, also did not produce foam cells; however, it is known that these cells contain PPAR γ . In fact BRL49653 treatment results in a reduction of lipid deposits when compared to the untreated cells (Figure 3A) and can inhibit the linoleic acid and retinoid promotion of foam cells (data not shown). These data collectively suggest for the first time that PPAR δ is the molecular target for fatty acids in the promotion of foam cell formation and that PPAR γ is a negative regulator of foam cell function.

Rosiglitazone (BRL49653) opposes foam cell formation.

Our data support the role of PPAR γ in the antagonism of macrophage activation and lipid accumulation. We have also observed that cell adherence of THP-1 cells upon treatment with BRL49653 is slower than observed for the untreated cells (data not shown). This inhibitory role was also suggested by two papers in *Nature* in which the negative regulation of inflammatory mediators by PPAR γ was demonstrated (13,14). We confirmed the anti-inflammatory action of TZD's by examining the effect of BRL49653 on IL-1 β expression. Indeed BRL49653 treatment leads to a drop in IL-1 β mRNA levels (Figure 4A). The reduction of TNF α mRNA, when compared to actin, was also observed, however this reduction was not so dramatic (Figure 4B). The uptake of lipid

by the scavenger receptor CD36 has been shown to be regulated by PPAR γ in THP-1 cells (16,17) and we find that CD36 is regulated by TZD in the activated THP-1 cell (Fig 3C), however these cells do not form foam cells (Fig 2). Therefore CD36 upregulation is not sufficient for foam cell formation and the overall effect of PPAR γ activation is to antagonize foam cell formation. TZD's are the thiazolidinedione class of drugs which includes BRL 49653.

Genetic modulation of foam cell model.

In order to ascertain whether or not PPAR δ was involved in the fatty acid induced foam cell formation, cell lines were generated from THP-1 cells that over-expressed PPAR δ or that expressed PPAR δ anti-sense mRNA. The cDNA encoding PPAR δ was cloned into a vector (pCLDN) that directs transcription under the control of a powerful enhancer from the human cytomegalovirus (Fig 5A). This vector also contains the neomycin resistance gene for the selection of targeted cells. The cDNA was inserted in both orientations in order to express the sense DNA for PPAR δ protein expression (pCLDNPPAR δ -S) and in the anti-sense direction to block PPAR δ expression (pCLDNPPAR δ -AS). The THP-1 cells were transfected with pCLDNPPAR δ -S or pCLDNPPAR δ -AS and selected with 1mg/ml G418 until robust growth in G418 was observed. The cells were then released from G418 selection as even the vector alone-controls would not differentiate in the presence of G418. G418 is known to be an inhibitor of protein kinase C activity and therefore is an antagonist of phorbol ester action. After recovery from G418 selection, over-expression of PPAR δ in six independently transfected polyclonal cell lines was confirmed by RNAase protection (Fig 5B) and western blotting (Fig 5C). These cell lines grow normally and do not display any adherence to the tissue culture flasks; however, when treated with PMA, they become adherent and accumulate large amounts of intracellular lipid when compared to the wild type cells, even in the absence of added fatty acids (Fig 6). BRL49653 treatment can prevent the PPAR δ -driven foam cell formation. Fatty acid analysis demonstrated that the increases in cellular lipid are mainly in triglycerides and that this pool is eliminated by the action of BRL49653 (Fig 6B). Using tritiated oleic acid we have analysed the uptake and efflux of fatty acids in parental and PPAR δ over-expressing cell lines. We have found that uptake and efflux are essentially identical between the two cell lines in the non-activated state (Fig 7A and B). In the activated cells, however, it is apparent that efflux is markedly lower from the PPAR δ over-expressing cell lines (Fig 7C).

PPAR δ over-expressing cells have ApoE mRNA levels that are dramatically reduced (35 fold) compared to the parental cell line (Fig 8). It is important to note that apoE is reduced to the same levels observed in the parental cell line after treatment with linoleic acid. This data reveals that PPAR δ mediates the fatty acid repression of the apoE gene expression. The cells expressing the PPAR δ antisense RNA (PPAR δ AS) also grew normally; however, when treated with PMA these cells did not differentiate (Fig 9A). Differentiation was not observed at any concentration of PMA (0.1 ng-25 ng/ml). Trypan blue staining of PPAR δ AS cells treated with PMA overnight revealed that the cells had died upon treatment (Fig 9B). There was no evidence for DNA condensation as judged by DAPI (4N,6-diamidino-2-phenylindole, Molecular Probes, Oregon) staining (data not

shown). DNA fragmentation was not seen in agarose gel electrophoresis of genomic DNA prepared from these dead cells (data not shown). Therefore the PMA treated PPAR δ -antisense cells do not appear to be dying by apoptosis. Using inhibitors for PKC and phospholipase A we have shown that we can block differentiation of parental THP-1 cells (Figure 10A); however, it appears that the PPAR δ -antisense cells die in the presence of phorbol ester and these inhibitors (Figure 10B). This suggests that the cause of death is not downstream of PKC activation in the differentiation process.

We have shown that PPAR δ is required for the inflammatory activation of macrophages (as evidenced by the activation of THP-1 cells), and that PPAR δ promotes foam cell formation. The overexpression of PPAR δ profoundly alters lipid storage in these cells and this is accomplished, in part, by altering the expression of the gene encoding apolipoprotein E. Inhibition (antagonism) of PPAR δ activity can prevent foam cell formation and the development of drugs that are inhibitors of PPAR δ activity are useful in the prevention and/or treatment of a large number of disorders that occur as a consequence of atherogenesis.

Example 2: Lipid accumulation is promoted by an agonist for PPAR δ .

A PPAR δ selective agonist (Compound F on page 9 of WO 97/28149) promotes lipid accumulation and promotes foam cell formation in the THP-1 assay described in Example 1. Although WO 97/28149 proposes using this PPAR δ agonist (as well as other disclosed compounds) to treat cardiovascular disease, we have now shown that this compound promotes foam cell formation.. This effect is apparent at less than 500nM and is maximal at between 5 and 10 μ M (see Figure 11A). Compound F co-operates with the RXR ligand LG100268 in the promotion of foam cell formation (see Figure 11B). This pharmacological activity is what we would predict from the studies described in Example 1. Compound F also promotes macrophage foam cell formation both in THP-1 cells (Figure 12) and primary human monocytes (Figure 13).

Example 3: Screening for inhibitors of PPAR δ activity.

Binding assays:

Radioligand filtration assays

Recombinant hPPAR δ is mixed with the radioactive ligand [3 H]₂ L-783483 as described in WO 97/28149 and in Berger *et al* (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 6718-6725 in the presence of a test compound. L-783483 has a K_d = 1nM. The mixture is applied to mixed cellulose filters and the fluid drawn through the filter by vacuum pressure. The radioactivity remaining on the filter will represent L-783483 bound to PPAR δ . A decrease in the radioactivity bound will indicate the presence of a competing PPAR δ compound. This assay determines binding properties of the test compound.

Fluorescent fatty acid displacement.

The binding of *cis* or *trans* parinaric acid provides a fluorescent assay for PPAR ligands. "*cis*-Parinaric acid" is 9,15-*cis*, 11,13 *trans*-parinaric acid. "*trans*-Parinaric acid" is 9,11,13,15 *trans*-parinaric acid. Both are available from Molecular Probes, Oregon. Recombinant PPAR δ is mixed with these fatty acids and a test compound would produce less fluorescence than observed in the presence of fatty acid/PPAR alone

if significant binding of the test compound occurs. This assay determines whether the test compound binds PPAR δ .

This assay would be automated easily by carrying it out in a multi-well format with an appropriate fluorimeter, giving a high throughput.

5 **Co-activator/receptor/ligand interaction assay (CARLA)**

The binding of co-activator proteins, such as RIP140 or SRC-1, to PPAR δ is dependent on the presence of a ligand. RIP140 and SRC-1 are proteins that bind PPAR δ (Krey *et al* (1997) *Mol. Endocrinol.* **11**, 779-791). Co-activators are translated *in vitro* in the presence of ³⁵S labelled methionine and mixed with purified recombinant hPPAR δ in the presence of test compounds. The hPPAR will be immunoprecipitated and the precipitate will be analysed by SDS/PAGE followed by autoradiography, the presence of a radioactive signal corresponding to the co-receptor will indicate the presence of a PPAR δ ligand. This assay may be used to identify co-activator binding that may prove to be antagonists; this is achieved by having known agonists present in each assay (see above).

15 **Functional assays.**

Transient transfection reporter construct assay

Cos-1 or CV-1 cells are transfected with an expression construct for PPAR δ and a reporter construct with the luciferase under the control of a PPAR dependent enhancer. PPAR δ -dependent enhancers include those derived from the acyl-CoA oxidase and cytochrome P450A6 genes. This may be performed in a variety of multi-well culture formats and the transfected cells are treated with a known agonist of PPAR δ and the test compounds. Cells are lysed *in situ* and assayed for luciferase activity in a luminometer. Luminometers are available that are compatible with high throughput screening. The assay described above examines the ability of the test compounds to block activity of a PPAR δ agonist.

25 **Stable cell lines reporter construct assay.**

Cell lines are transfected with constructs similar to those outlined above except that they also encode antibiotic resistance markers. This allows for the selection of cell lines that stably express PPAR δ and contain the reporter sequences integrated into the genome. This cell line is grown and used for the detection of PPAR δ activating compounds without the need for repetitive and costly transfections.

30 **Example 4: Foam cell assays**

Foam cell assays are used to identify potential anti-atherogenic compounds. THP-1 cells in 96-well plate culture are treated with 0.1 to 10ng/ml PMA in order to induce macrophage differentiation. THP-1 cells are available as ECACC Accession No 88081201.

A source of fatty acid is supplied which is either serum (CPSR-3 serum replacement from Sigma) or 20-100 μ M linoleic acid.

40 Accumulation of fatty acid in the differentiating macrophage cells is measured in the presence or absence of a test compound after 3 to 7 days using Nile Red stain.

Test compounds which reduce the accumulation of fat compared to the absence of test compound are selected as potential anti-atherogenic agents or as lead compounds.

Example 5: Prostate cancer cell tests

We have found that the PPAR δ agonist, Compound F, can stimulate prostate epithelial growth. Both minimally transformed cells PNT1A and non-transforming prostate cancer cells (LNCaP) have growth stimulated by up to 40% by low concentrations of Compound F. This effect is also seen with the RXR ligand LG100268. Also, low concentrations of both Compound F and LG100268 that do not significantly increase cell growth, stimulate cell growth when added together in the culture medium. The highly transformed prostate cancer cell line PC3 grows the fastest out of these lines and is not stimulated by Compound F.

We have transfected PC3 cells with expression constructs for PPAR δ antisense RNA; these have all failed to grow. In contrast, cell lines expressing PPAR γ antisense RNA have been generated, which have altered but sustainable growth. In all experiments, cell lines containing the empty expression vector have been generated and have no phenotype. These experiments support the assertion that PPAR δ is proliferative and that PPAR δ antagonists will be useful in the treatment of cancer.

Cell lines were plated at 2,500 cells per well in a 24-well plate and cultured in RPMI containing 5% dextran-coated charcoal-treated FCS. Increasing concentrations of Compound F or LG100268 were included in the culture medium and the cultures were maintained for 7 days with changes of drugs and medium every 48 hours. The final cell number in each well was then determined by a colorimetric assay (Landegreen U. *J. Immunol. Meth.* 67, 379-388, (1984)) and the relative growth expressed as a percentage of the cell number in the control wells.

REFERENCES

1. Issemann, I. & Green, S. (1990) "Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators" *Nature* **347**, 645-50.
2. Dreyer, C. *et al* (1992) "Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors" *Cell* **68**, 879-87.
3. Palmer, C.N.A. *et al* (1998) "Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver" *Molecular Pharmacology* **53**, 14-22.
4. Lee, S.S-T. *et al* (1995) "Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators" *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3012-3022.
5. Forman, B.M. *et al* (1995) "15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma" *Cell* **83**, 803-812.
6. Lehmann, J.M. *et al* (1995) "An anti-diabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for Peroxisome proliferator activated receptor γ " *J. Biol. Chem.* **270**, 12953-12956.
7. Barak, Y. *et al* (1998) "PPAR γ -null mice - Early embryonic lethality due to a putative placental defect" Abstract No 303. Keystone Symposium on The Nuclear Receptor Gene Family. Incline Village, Nevada.
8. Schmidt, A. *et al* (1992) "Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids" *Molecular Endocrinology* **6**, 1634-1641.
9. Saxena, U. *et al* (1992) "Lipoprotein lipase-mediated lipolysis of very low density lipoproteins increases monocyte adhesion to aortic endothelial cells" *Biochemical & Biophysical Research Communications* **189**, 1653-1658.
10. Frostegard, J. *et al* (1990) "Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937" *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **87**, 904-908.
11. Terkeltaub, R. *et al* (1994) "Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity" *Arterioscler. Thromb.* **14**, 47-53.
12. Ross, R. (1993) "The pathogenesis of atherosclerosis; A perspective for the 1990s" *Nature* **362**, 801.

13. Ricote, M. *et al* (1998) "The peroxisome proliferator activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation" *Nature* 391, 79-82.
- 5 14. Jiang, C. *et al* (1998) "PPAR γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines" *Nature* 391, 82-86.
15. Marx, N. *et al* (1998) "Macrophages in human atheroma contain PPAR γ " *Am. J. Pathol.* 153, 17-23.
- 10 16. Tontonoz, P. *et al* (1998) "PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidised LDL" *Cell* 93, 241-252.
- 15 17. Nagy, L. *et al* (1998) "Oxidised LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ " *Cell* 93, 229-240.

CLAIMS

1. A method of preventing or reducing foam cell development from macrophages or other cells, or removing foam cells, the method comprising contacting said macrophages or other cells or foam cells with an effective amount of an inhibitor of PPAR δ activity.
5
2. A method of preventing or reducing foam cell development from macrophages or other cells, or removing foam cells, in a patient, the method comprising administering to the patient an effective amount of an inhibitor of PPAR δ activity.
10
3. A method according to Claim 2 wherein the foam cell development from macrophages or other cells is associated with any one of atherosclerosis or diseases associated with atherosclerosis, heart disease, stroke, peripheral artery diseases, angina, restenosis and atheroma.
15
4. A method of preventing or treating a vascular disease associated with plaque formation and/or thrombotic blockage of the blood vessels in a patient, the method comprising administering to the patient an effective amount of an inhibitor of PPAR δ activity.
20
5. A method according to Claim 4 wherein the vascular disease is any one of atherosclerosis, heart disease, stroke or peripheral artery disease.
6. A method of preventing or reducing proliferation of cells, which method
25 comprises contacting the cells with an inhibitor of PPAR δ activity.
7. A method of treating or preventing cancer in a patient, the method comprising administering to the patient an effective amount of an inhibitor of PPAR δ activity.
- 30 8. A method according to Claim 6 wherein the cancer is any one of skin cancer, breast cancer, colon cancer or prostate cancer.
9. A method of treating or preventing Alzheimer's disease in a patient, the method comprising administering to the patient an effective amount of an inhibitor of PPAR δ activity.
35
10. A method according to any one of the preceding claims wherein the inhibitor of PPAR δ activity is a compound which prevents the expression of PPAR δ in a cell.
- 40 11. A method according to Claim 10 wherein the compound is a nucleic acid-based molecule.

12. A method according to Claim 11 wherein the nucleic acid-based inhibitor of PPAR δ activity in a cell is any one of a PPAR δ -selective antisense molecule or a PPAR δ -selective ribozyme.
- 5 13. A method according to any one of Claims 1 to 9 wherein the compound inhibits the activity of PPAR δ protein activity.
14. A method according to any one of the preceding claims wherein the inhibitor of PPAR δ activity is a compound which blocks the effect of a PPAR δ agonist.
- 10 15. An inhibitor of PPAR δ activity for use in medicine.
16. A pharmaceutical composition comprising an inhibitor of PPAR δ activity and a pharmaceutically-acceptable carrier.
- 15 17. Use of an inhibitor of PPAR δ activity in the manufacture of a medicament for preventing or reducing foam cell development from macrophages, or removing foam cells, in a patient.
- 20 18. Use of an inhibitor of PPAR δ activity in the manufacture of a medicament for preventing or treating a vascular disease associated with plaque formation and/or thrombotic blockage of the blood vessels.
- 25 19. Use of an inhibitor of PPAR δ activity in the manufacture of a medicament for treating or preventing cancer.
- 30 20. Use of an inhibitor of PPAR δ activity in the manufacture of a medicament for treating or preventing Alzheimer's disease.
- 35 21. A method of identifying a compound which may, or which can be used as a lead compound to produce a compound which may, be useful in medicine the method comprising selecting a compound which inhibits PPAR δ activity.
- 40 22. A method of identifying a compound which may, or which can be used as a lead compound to produce a compound which may, (1) prevent or reduce foam cell development from macrophages or other cells, or remove foam cells; or (2) prevent or be useful in treating a vascular disease associated with plaque formation and/or thrombotic blockage of the blood vessels; or (3) prevent or be useful in treating cancer; or (4) prevent or be useful in treating Alzheimer's disease, the method comprising selecting a compound which inhibits PPAR δ activity.
23. A method according to Claim 22 wherein the compound identified is subsequently tested in a further screen to determine whether it may (1) prevent or reduce foam cell

development from macrophages or other cells, or remove foam cells; or (2) prevent or is useful in treating a vascular disease associated with plaque formation and/or thrombotic blockage of the blood vessels; or (3) prevent or is useful in treating cancer; or (4) prevent or is useful in treating Alzheimer's disease.

5

24. A method according to Claim 22 wherein the compound identified as a lead compound is modified.

25. A method of identifying a compound which inhibits PPAR δ activity the method comprising selecting from a library of test compounds any compound which inhibits PPAR δ activity.

10

26. A method according to any one of Claims 22 to 24 wherein the compound is selected by its ability to inhibit PPAR δ protein function or activity.

15

27. A method according to any one of Claims 22 to 25 wherein the compound is selected by its ability to inhibit the production of PPAR δ in a cell.

28. A method of identifying a compound which may, or which can be used as a lead compound to produce a compound which may, (1) prevent or reduce foam cell development from macrophages or other cells, or remove foam cells or (2) prevent or be useful in treating a vascular disease associated with plaque formation and/or thrombotic blockage of the blood vessels, the method comprising the steps of selecting:

- (a) a suitable primary cell population or cell line,
25 (b) supplying to the cell line an inflammatory stimulus or growth factor which facilitates differentiation to a foam cell precursor,
(c) supplying to the foam cell precursor a suitable concentration of fatty acid, and
(d) measuring the accumulation of fatty acid in the cell in the presence or absence of the compound.

30

29. A method according to Claim 28 wherein the primary cell population consists of peripheral monocytes and macrophages and the cell line is a leukocyte cell line.

30. A method according to Claim 29 wherein the leukocyte cell line is a monocytic or macrophage-like cell line.

35

31. A method according to Claim 30 wherein the cells are THP-1 or U937 cells.

32. A method according to any one of Claims 28 to 31 wherein the growth factor is a phorbol ester or GMCSF.

40

33. A method according to Claim 32 wherein the phorbol ester is PMA.

34. A method according to any one of Claims 28 to 33 wherein the fatty acid is supplied in serum or as linoleic acid.
- 5 35. A method according to any one of Claims 27 to 34 wherein the fatty acid accumulation is measured by fatty acid staining.
36. A compound identifiable by the methods of any one of Claims 21 to 35.
- 10 37. A compound according to Claim 36 for use in medicine.
38. A pharmaceutical composition comprising a compound according to Claim 36 and a pharmaceutically acceptable carrier.
- 15 39. A method of treatment according to any one of Claims 1 to 12 wherein the inhibitor of PPAR δ activity is identifiable by the method of any one of Claims 21 to 26.
- 20 40. A method of preventing or reducing foam cell development from macrophages or other cells, or removing foam cells, or preventing or treating a vascular disease associated with plaque formation and/or thrombotic blockage of the blood vessels, the method comprising administering to the patient an effective amount of a compound identifiable by the method of any one of Claims 27 to 33.
- 25 41. Use according to any one of Claims 16 to 19 wherein the inhibitor of PPAR δ activity is identifiable by the method of any one of Claims 21 to 26.
- 30 42. Use of a compound identifiable by the method of any one of Claims 28 to 35 in the manufacture of a medicament for preventing or reducing foam cell development from macrophages or other cells, or removing foam cells, or treating or preventing a vascular disease associated with plaque formation and/or thrombotic blockage of the blood vessels.
- 35 43. Any novel method of treating or preventing vascular disease associated with plaque formation and/or thrombotic blockage of the blood vessels as herein disclosed.
- 40 44. Any novel method of identifying a compound useful in preventing or treating vascular disease associated with plaque formation and/or thrombotic blockage of the blood vessels as herein disclosed.
45. A method of preventing or treating inflammatory disorders which method comprises administering to the patient an effective amount of an inhibitor of PPAR δ activity.

46. A method according to claim 1 wherein the macrophages or other cells are those involved in atherosclerotic pathology.
- 5 47. A method according to claim 2 wherein the macrophages or other cells are those involved in atherosclerotic pathology.
48. Use according to claim 17 wherein the macrophages are those involved in atherosclerotic pathology.
- 10 49. A method according to claim 22 wherein the macrophages or other cells are those involved in atherosclerotic pathology.

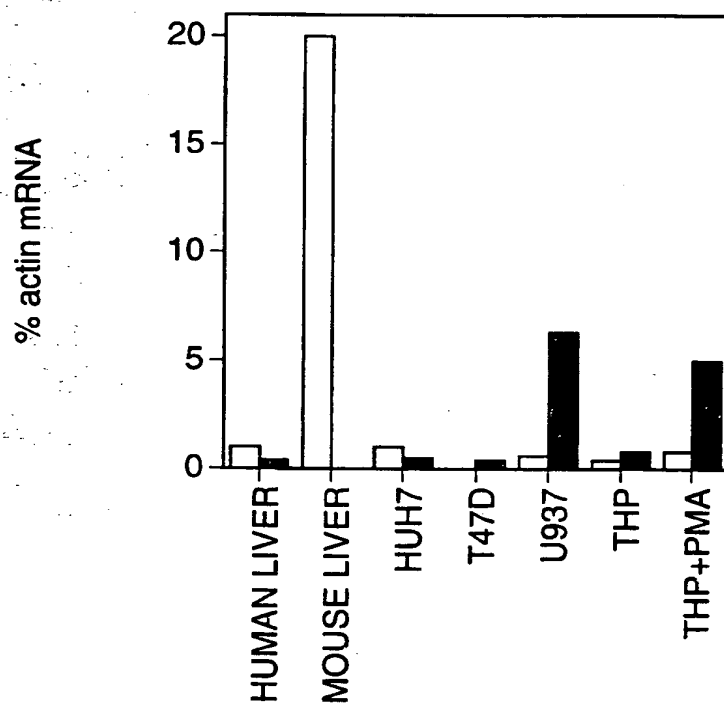
FIGURE 1

FIGURE 2

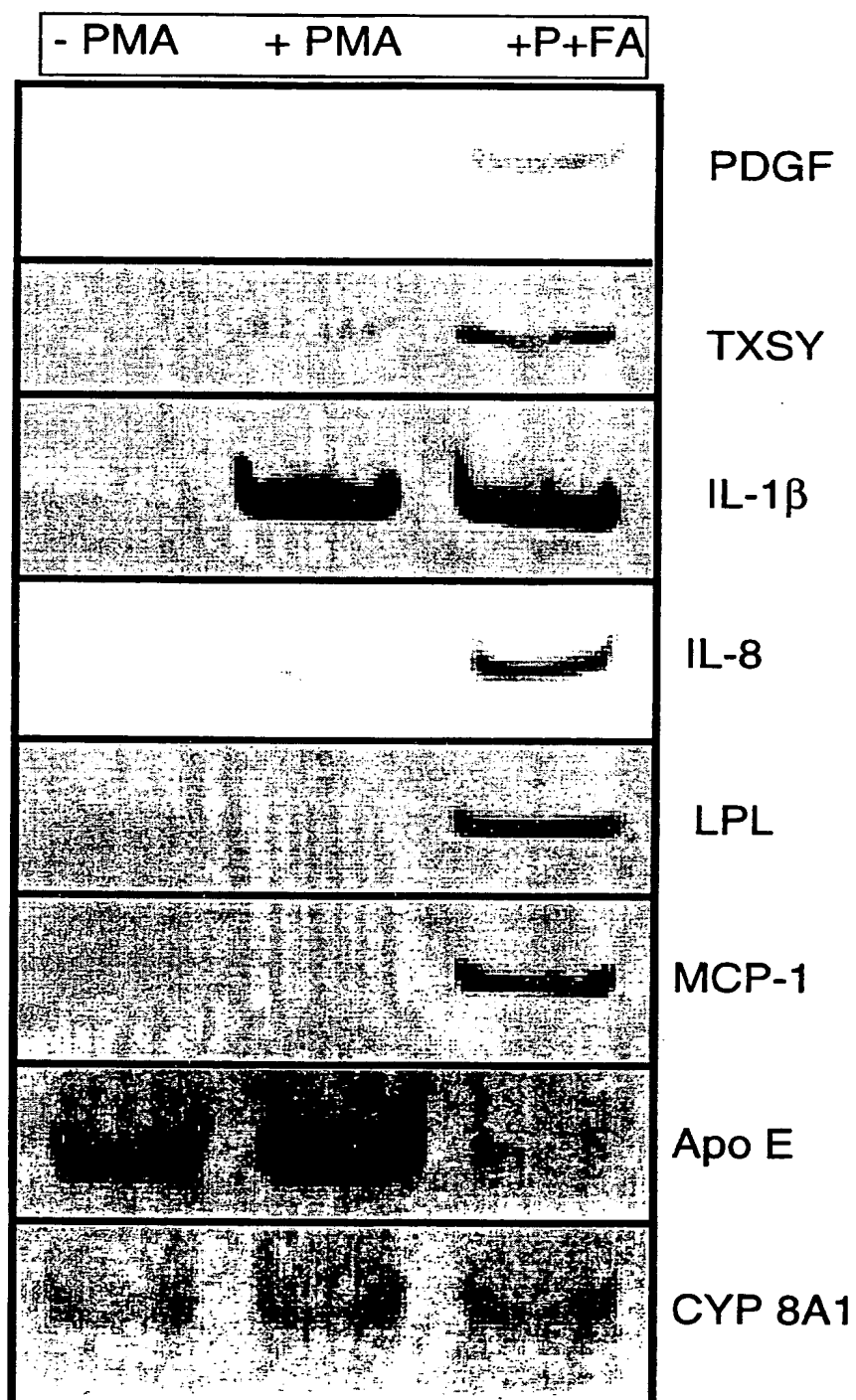
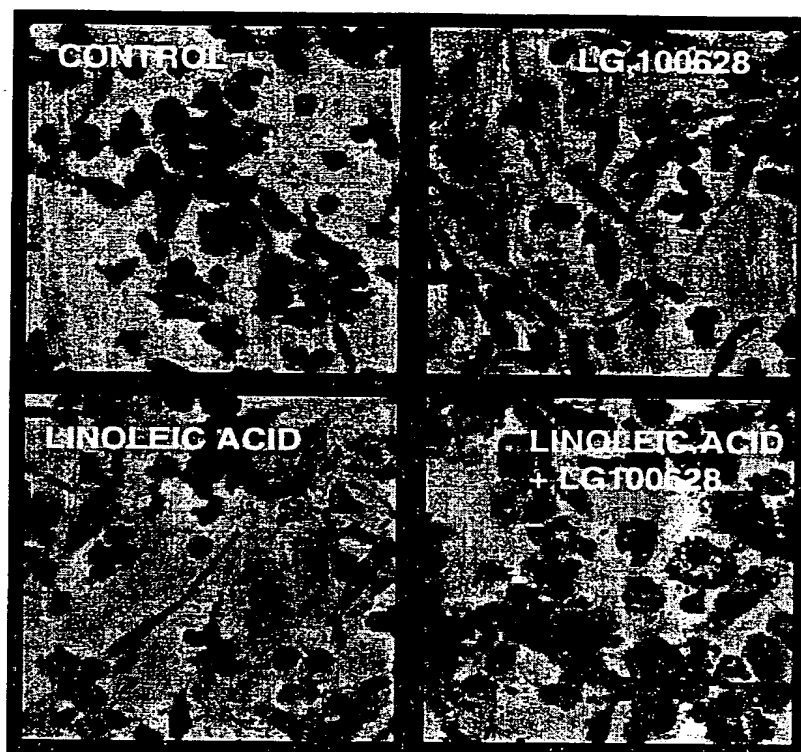
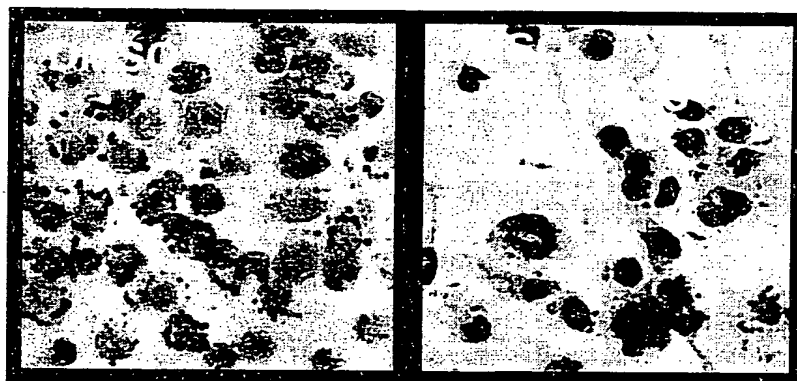
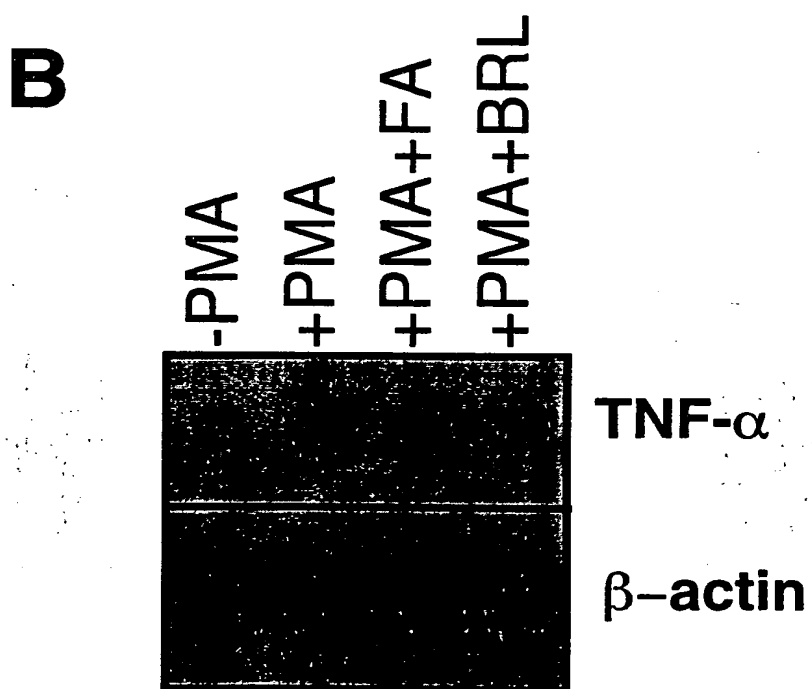
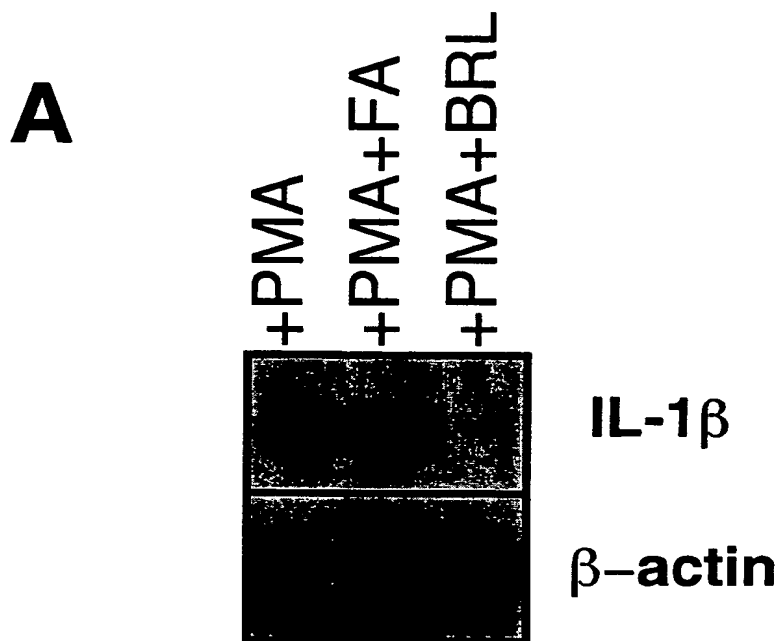


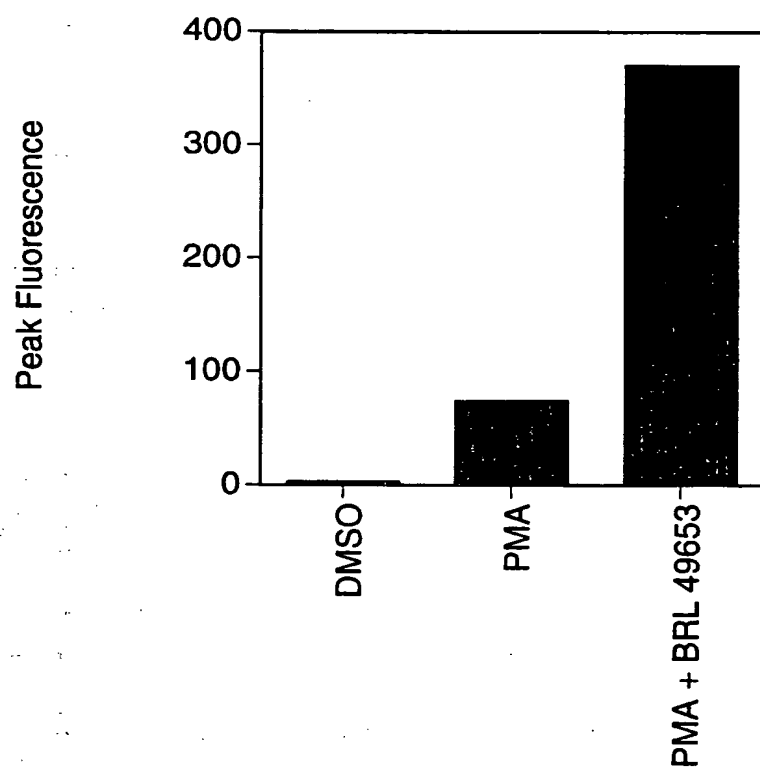
FIGURE 3.**A****B**

4/18

FIGURE 4

5/18

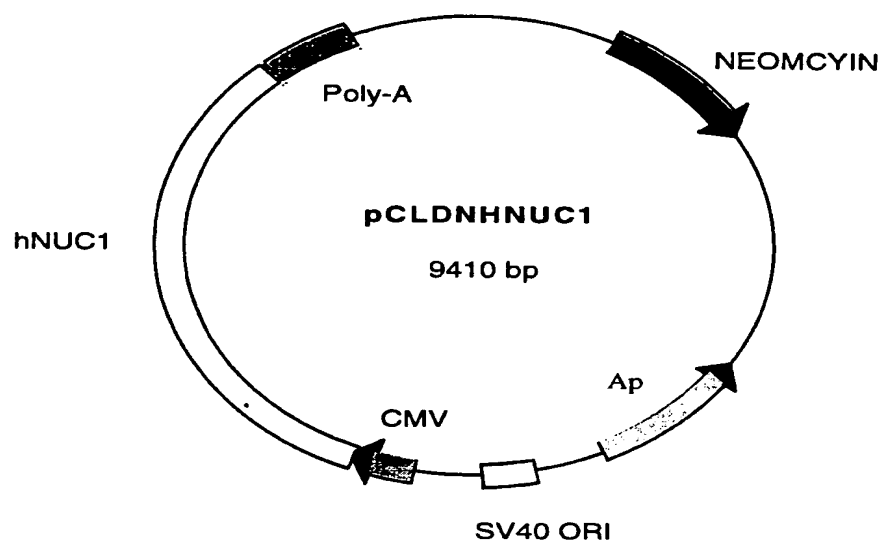
FIGURE 4C



6/18

A

FIGURE 5



B

PARENTAL

delta-1

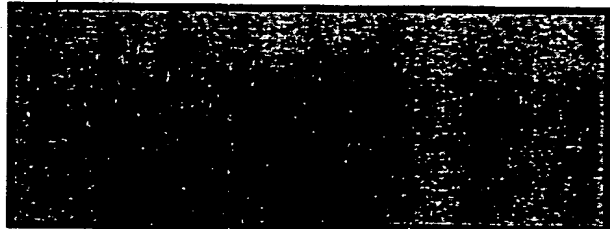
delta-2

delta-3

delta-4

delta-5

delta-6



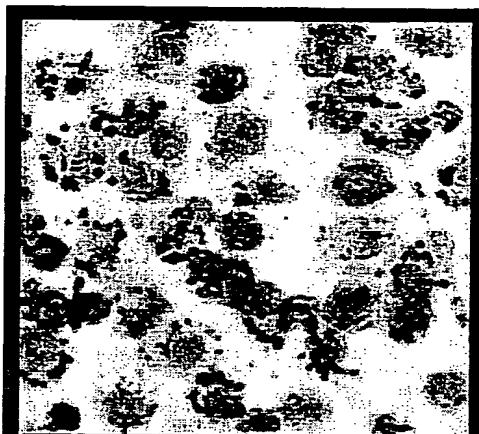
C

delta-1
PARENTAL



FIGURE 6A

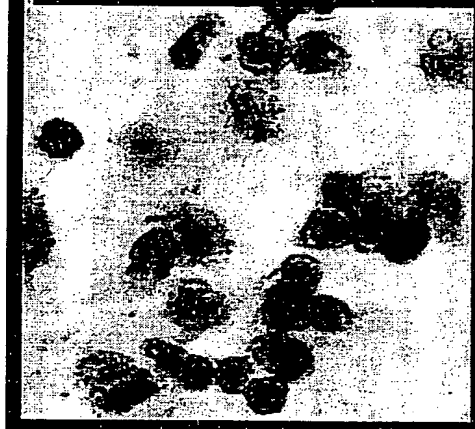
WT



DELTA

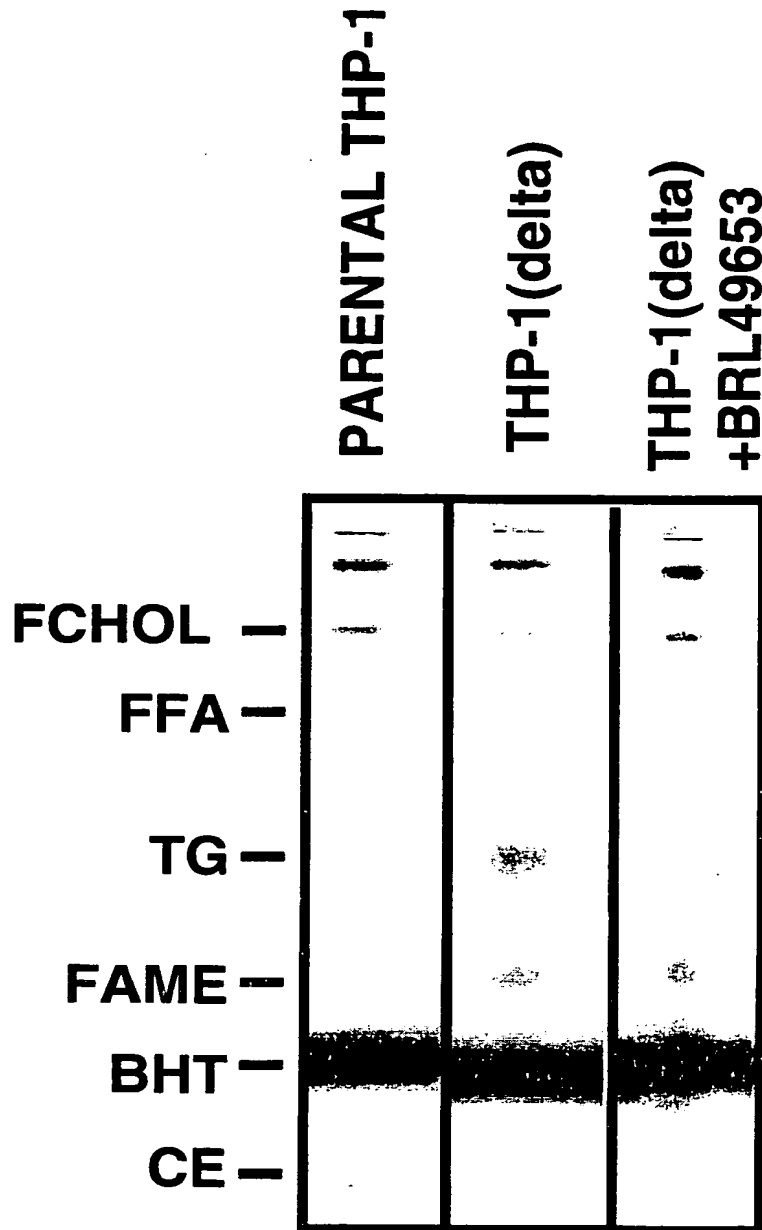


**DELTA
+BRL49653**



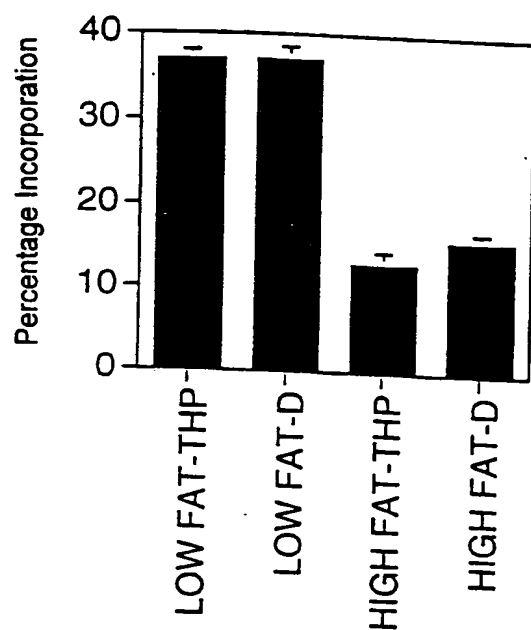
8/18

FIGURE 6B

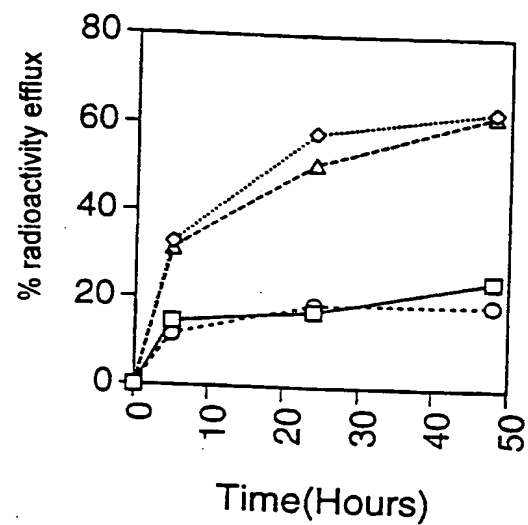


9/18
Figure 7

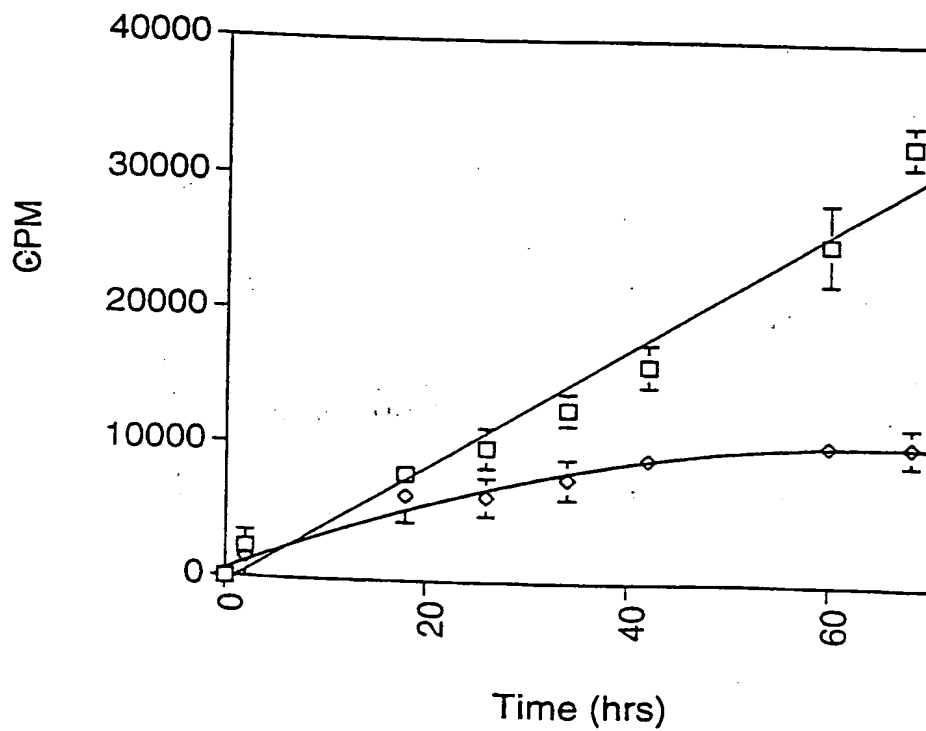
A



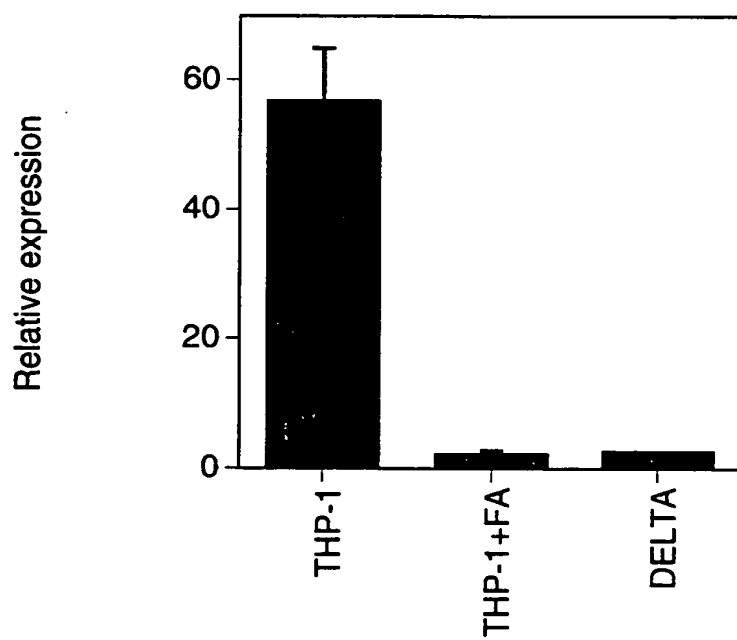
B



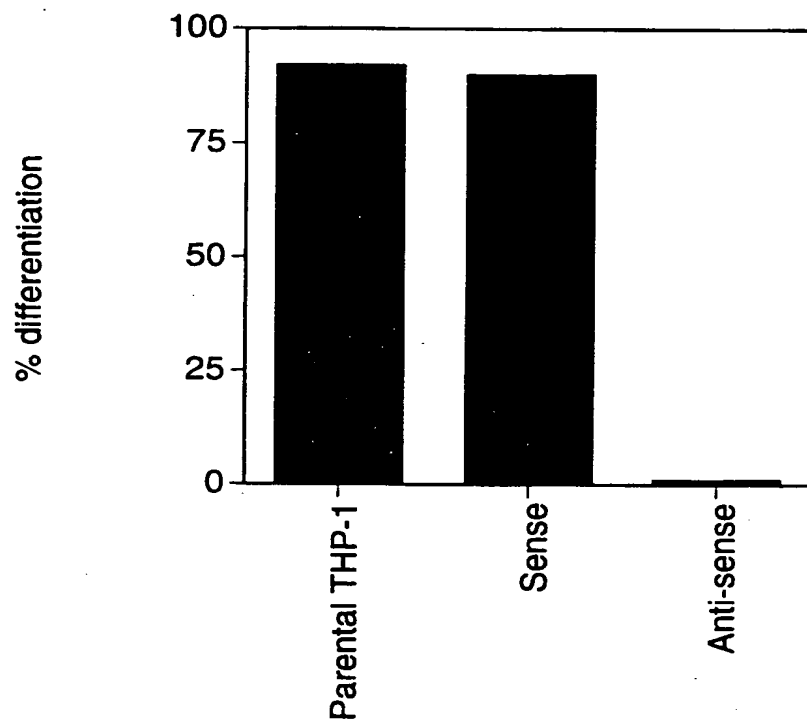
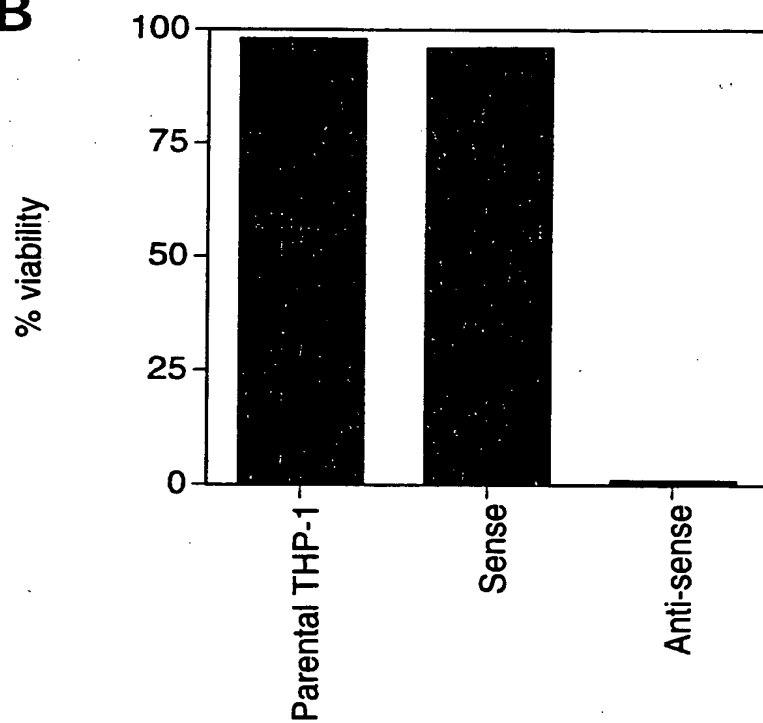
C



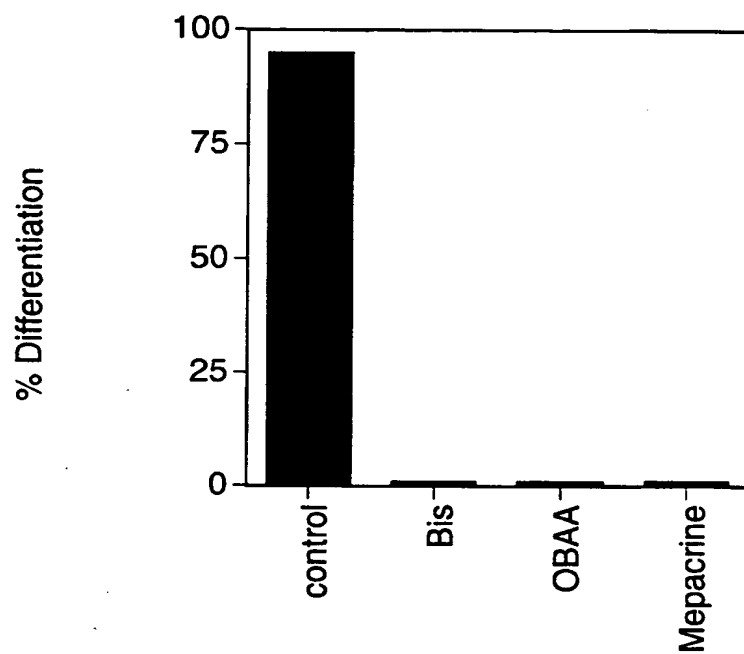
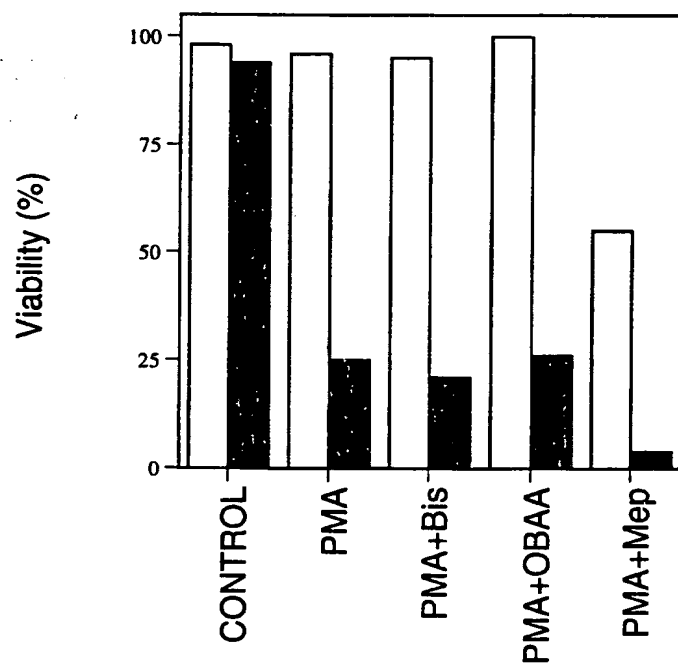
10/18

FIGURE 8

11/18

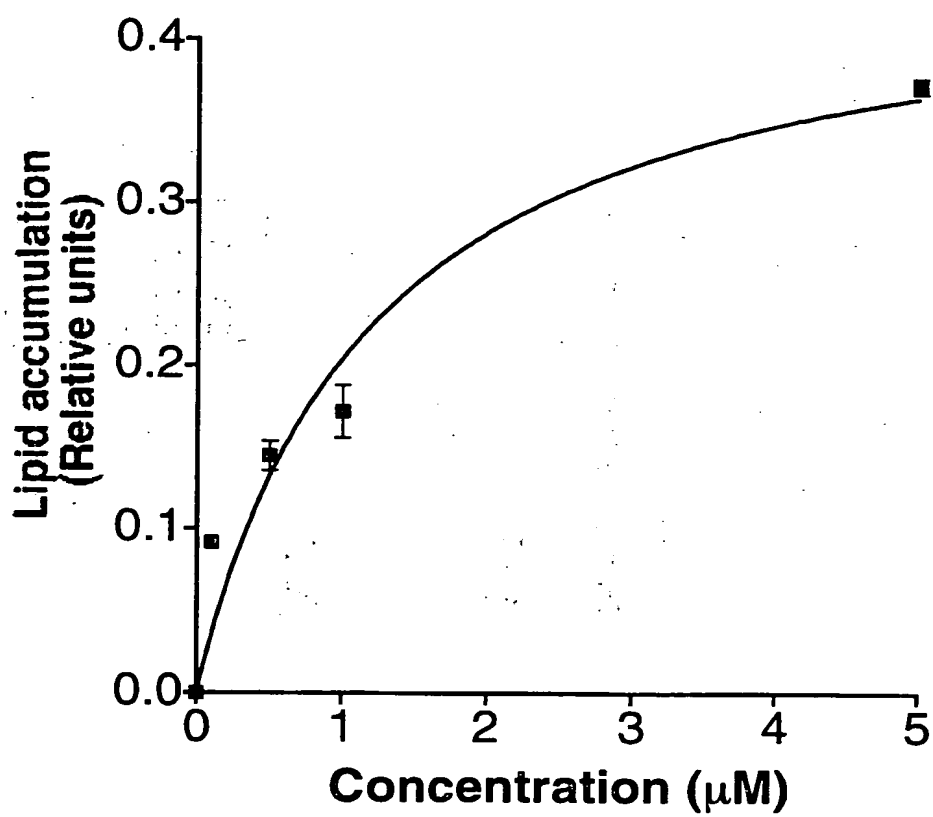
FIGURE 9**A****B**

12/18

Figure 10**A****B**

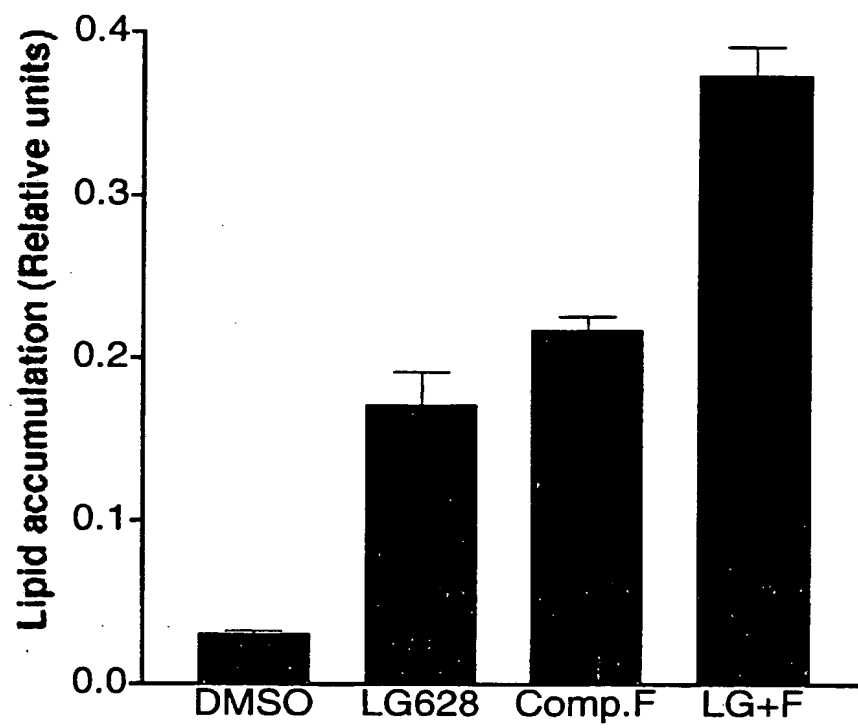
13/18

Figure 11a



14/18

Figure 11b



15/18
Figure 12



4 day treatment



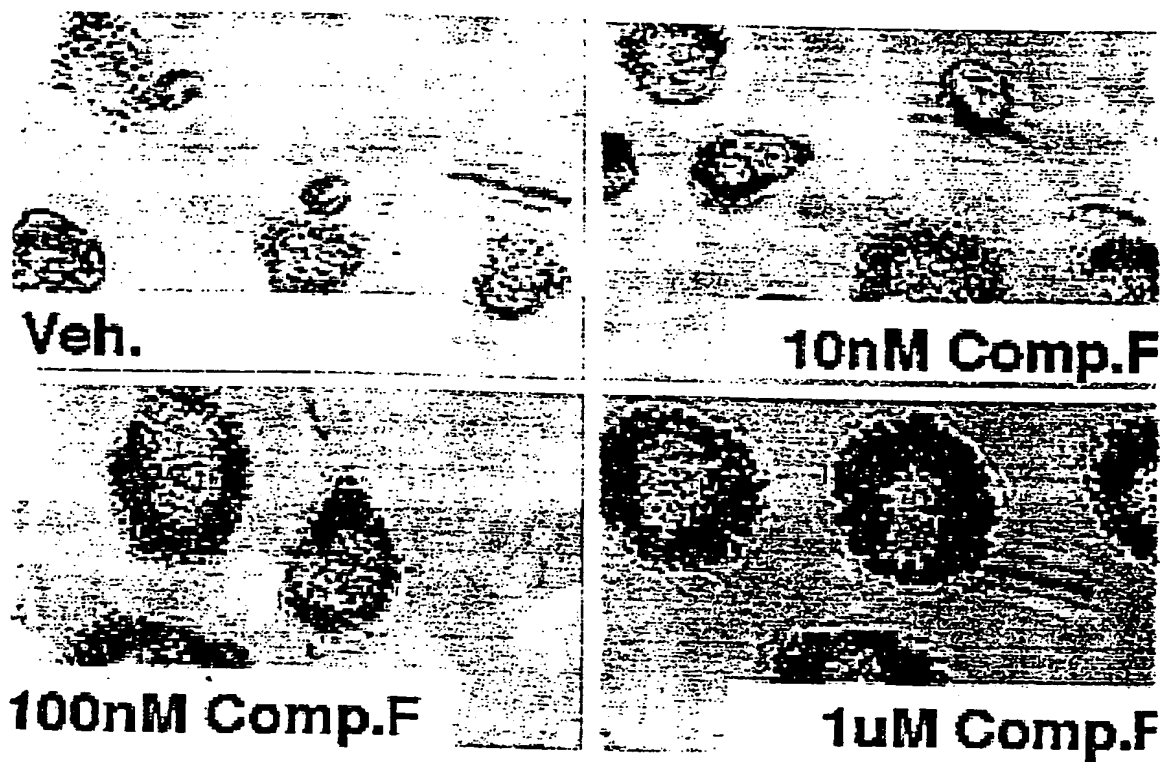
15 day treatment

DMSO

Compound F

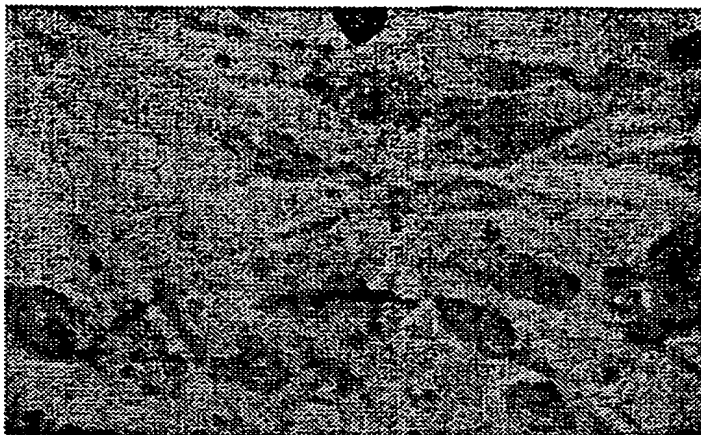
16/18

Figure 13

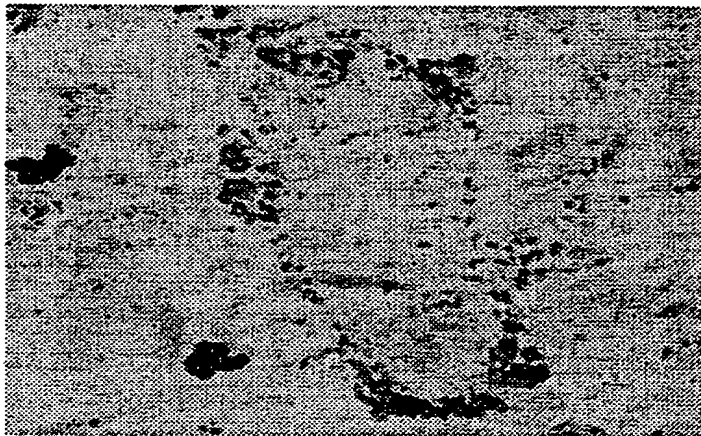


17/18
Figure 14

CONTROL



COMPOUND F

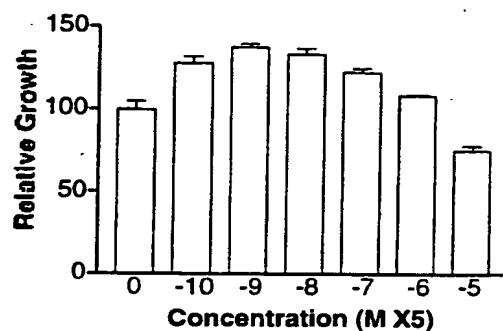


18/18

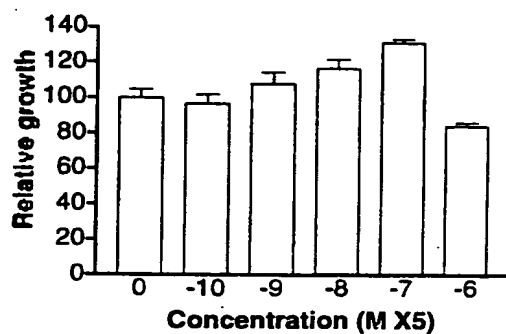
Figure 15

STIMULATION OF PROSTATE CANCER CELL GROWTH BY COMPOUND F

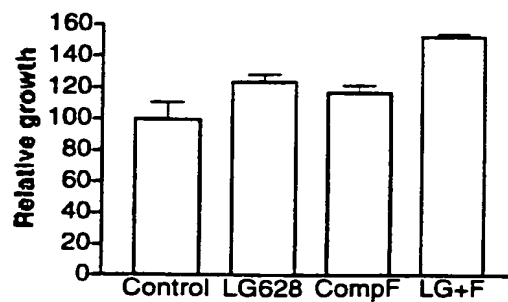
PNT1A



LNCaP



PPAR δ and RXR cooperate in promoting cell growth (LNCaP)



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 February 2001 (01.02.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/07066 A3

- (51) International Patent Classification⁷: **A61K 38/17**, 31/00, 48/00, G01N 33/50, A61P 9/10, 25/28, 29/00, 35/00
- (21) International Application Number: **PCT/EP00/06986**
- (22) International Filing Date: **19 July 2000 (19.07.2000)**
- (25) Filing Language: **English**
- (26) Publication Language: **English**
- (30) Priority Data:
9917405.4 **23 July 1999 (23.07.1999)** **GB**
- (71) Applicant (for all designated States except US): **THE UNIVERSITY OF DUNDEE [GB/GB]**; 11 Perth Road, Dundee, Tayside DD1 4HN (GB).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **PALMER, Colin, Neil, Alexander [GB/GB]**; The University of Dundee, Biomedical Research Centre, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee, Tayside DD1 9SY (GB). **VOSPER, Helen [GB/GB]**; The University of Dundee, Biomedical Research Centre, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee, Tayside DD1 9SY (GB). **WOLF, Charles, Roland [GB/GB]**; The University of Dundee, Biomedical Research Centre, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee, Tayside DD1 9SY (GB).
- (74) Agent: **RUTTER, Keith**; SmithKline Beecham, Two New Horizons Court, Brentford, Middlesex TW8 9EP (GB).
- (81) Designated States (national): **AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.**
- (84) Designated States (regional): **ARIPO** patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), **Eurasian** patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), **European** patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), **OAPI** patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
9 August 2001
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: **PPAR DELTA INHIBITORS FOR THE TREATMENT OF CARDIOVASCULAR DISEASES**

(57) Abstract: A method of preventing or reducing foam cell development from macrophages, or removing foam cells, in a patient, the method comprising administering to the patient an effective amount of an inhibitor of PPAR δ activity. A method of preventing or treating a vascular disease associated with plaque formation and/or thrombotic blockage of the blood vessels in a patient, the method comprising administering to the patient an effective amount of an inhibitor of PPAR δ activity.

WO 01/07066 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int .lational Application No
PCT/EP 00/06986

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K38/17 A61K31/00 A61K48/00 G01N33/50 A61P9/10
A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, LIFESCIENCES, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	WILLSON T M ET AL: "The PPARs: From orphan receptors to drug discovery." JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 43, no. 4, 24 February 2000 (2000-02-24), pages 527-550, XP002158740	
P,A	----- PETERS J M ET AL: "Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta (delta)." MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 20, no. 14, July 2000 (2000-07), pages 5119-5128, XP002158741 cited in the application ----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 January 2001

Date of mailing of the international search report

19/02/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Teyssier, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/06986

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BERGER J ET AL: "Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 10, 5 March 1999 (1999-03-05), pages 6718-6725, XP002158742 cited in the application	
X	the whole document	21,25-27
A	RICOTE M ET AL: "Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 95, no. 13, 23 June 1998 (1998-06-23), pages 7614-7619, XP002158743	
A	POLLMAN M J ET AL: "Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease." NATURE MEDICINE, vol. 4, no. 2, February 1998 (1998-02), pages 222-227, XP002158744 cited in the application	
A	WO 97 28149 A (AUWERX JOHAN ;BERGER JOEL P (US); MERCK & CO INC (US); MOLLER DAVI) 7 August 1997 (1997-08-07) cited in the application	
P,X	MANO H ET AL: "Cloning and function of rabbit peroxisome proliferator-activated receptor delta/beta in mature osteoclasts." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 11, 17 March 2000 (2000-03-17), pages 8126-8132, XP002158745 the whole document	15,16, 36-38
X	WO 98 43081 A (LEFEBVRE ANNE MARIE ;AUWERX JOHAN (FR); PASTEUR INSTITUT (FR); BRI) 1 October 1998 (1998-10-01) page 9, line 8 - line 15 page 15, line 24 - line 32 the whole document	15,16, 21, 25-27, 36-38,45
A		

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/06986

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHOU G ET AL: "Nuclear receptors have distinct affinities for coactivators: Characterisation by fluorescence resonance energy transfer" MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, vol. 12, no. 10, October 1998 (1998-10), pages 1594-1604, XP002915572 the whole document	21,25-27
X	KREY G ET AL: "Fatty acids, eicosanoids and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependant receptor ligand assay" MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, vol. 11, no. 6, June 1997 (1997-06), pages 779-791, XP002915086 the whole document	21,25-27
P,A	WO 00 32190 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE) 8 June 2000 (2000-06-08) the whole document	9,20

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)